



**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**  
**INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL**

PERFIL DE ANTICORPOS ANTI-*Plasmodium falciparum* E  
CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS EM INDIVÍDUOS COM  
SUSPEITA CLÍNICA DE MALÁRIA

**VANESSA ALEXANDRA AGOSTINHO MARTINS**

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DE GRAU DE MESTRE EM  
SAÚDE TROPICAL**

**(ABRIL, 2014)**



# **Universidade Nova de Lisboa**

## **Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

Perfil de anticorpos anti-*Plasmodium falciparum* e citocinas pró-inflamatórias em indivíduos com suspeita clínica de malária.

**Autor:** Vanessa Alexandra Agostinho Martins

Licenciatura em Análises Clínicas e Saúde Pública

**Orientador:** Investigador Doutor Marcelo Sousa Silva

**Coorientador:** Professora Doutora Rosa Maria Figueiredo Teodósio

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Saúde Tropical.

## ERRATA

<b>Folha</b>	<b>Linha</b>	<b>Onde se lê</b>	<b>Leia-se</b>
6	nota de rodapé	glandulares	granulares
62	4	endêmicas	endémicas

## ***Dedicatória***

*Aos meus pais, os melhores, que sempre me fizeram acreditar em mim e que o estudo, trabalho e honestidade compensam e por sempre me terem dado todas as condições para sonhar e ser feliz.*

*Ao Tiago, por ser o melhor irmão que se pode desejar.*

*Aos meus avós que sempre me desejaram o melhor. Um especial obrigado ao avô Diamantino que por demasiado pouco tempo presente na minha vida fez de mim a criança mais feliz. Á avó Anunciação que esteve sempre presente em todas as etapas da minha vida e que foi muitas vezes, verdadeira mãe.*

*Ao Nelson por, á sua maneira, nunca me deixar duvidar de mim.*

*Á Carina, amiga, irmã, companheira de todos os amargos e jubilosos momentos.*

*Aos amigos de ontem, hoje e sempre.*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Investigador Doutor Marcelo Silva e Prof. Doutora Rosa Teodósio pelo apoio incansável e estímulo permanente em todos os momentos da realização deste trabalho. Ao Doutor Marcelo pelo apoio laboratorial, pela constante disponibilidade, dedicação e entusiasmo transmitido neste trabalho. Para sempre grata.

Ao Prof. Doutor Jorge Atouguia e a todos os professores que lecionaram, por me terem transmitido maior e melhor conhecimento e conseguido entusiasmar nesta aprendizagem da Medicina Tropical e manter-me sempre interessada, mesmo após os turnos da noite.

À Investigadora Doutora Fátima Nogueira da UEI Parasitologia Médica do IHMT/UNL pela preparação e obtenção dos extratos proteicos de *Plasmodium falciparum*.

A todos os novos colegas de mestrado, e agora também amigos, que tive o prazer de conhecer e com quem também aprendi muito. Joana Inês Silva este trabalho também é para ti.

À Ana Paula Maduro e Laura Cravo, técnicas de laboratório, pela colheita e processamento das amostras de sangue dos pacientes com malária importada.

À Karina que me prestou uma ajuda fundamental no laboratório e se tornou uma inspiração pela sua sede de saber.

Ao João Pereira, Jailson Querido, Rita Costa, Ruth Medeiros, Aline Ribeiro, Joana Monteiro, Cláudia Moreno, Salomé Magalhães, Sónia Pestana, Ana Teixeira e todos os que me apoiaram, esclareceram dúvidas, e ajudaram a tornar os dias inglórios em dias de maior experiência e me colocaram um sorriso no rosto.

Aos colegas do Instituto Português do Sangue e Transplantação que me incentivaram e me fizeram alguns turnos para que conseguisse concluir mais esta etapa.

À Sandra Azevedo da Divisão Académica pela sua ajuda e paciência.

## RESUMO

A malária é uma doença endémica em 109 países localizados ao longo dos trópicos. Na Europa, a malária foi erradicada exceto no Azerbaijão, Geórgia, Quirguistão, Tadjiquistão e Turquia. Estima-se que 25-30 milhões de pessoas viajem anualmente da Europa para áreas com transmissão de malária. Em Portugal a malária permaneceu endémica até cerca de 1950 e nas últimas décadas, o aumento do volume de viagens internacionais, nomeadamente para destinos tropicais, endémicos para esta doença, acarretaram também o aumento dos casos no nosso país. A sua transmissão é feita por algumas espécies de mosquitos *Anopheles*. A malária severa por *Plasmodium falciparum*, incluindo malária cerebral (MC), anemia por malária severa (AMS) e malária placentária (MP), continua a ser uma importante causa de morbilidade e mortalidade.

O objetivo geral deste estudo prende-se na análise do perfil de anticorpos anti-*Plasmodium falciparum* e citocinas pró-inflamatórias em indivíduos com suspeita clínica de malária, que estiveram em diferentes regiões endémicas do continente africano, entre as quais Angola, Moçambique, Guiné, São Tomé e Príncipe, Gabão e Congo. Sabe-se que em regiões endémicas a imunidade natural adquirida contra *P. falciparum* é mediada por anticorpos do tipo IgG. Através de ensaios imunoenzimáticos (ELISA) distinguiu-se a população com e sem reatividade serológica a anticorpos anti-*P.falciparum*, frente a um grupo controlo (soros de pacientes saudáveis de Portugal, que nunca estiveram em zonas endémicas para malária). Através do método ELISA procedeu-se à determinação dos níveis de anticorpos totais anti-*Plasmodium falciparum* IgG, IgM, IgG1, IgG3 e IgG4 e à concentração sérica das citocinas pró-inflamatórias C5a do sistema complemento, proteína C reativa (CRP) e IFN- $\gamma$ .

Das cento e trinta e duas amostras estudadas, sessenta e cinco foram classificadas como positivas para *Plasmodium spp.* As principais manifestações clínicas foram de febre, cefaleia e mialgias. Apenas quarenta amostras foram classificadas como serologicamente reativas para *P. falciparum*. Neste grupo de doentes observou-se um aumento dos mediadores inflamatórios doseados, nomeadamente IgGs totais, IgG1, IgG3, e IgM anti-*P. falciparum*, C5a, CRP e IFN- $\gamma$ .

Pretendeu-se com este estudo contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos da malária importada.

**Palavras-chave:** Malária, *Plasmodium falciparum*, citocinas, ELISA, anticorpos anti-*P.falciparum*.

## ABSTRACT

Malaria is an endemic disease in 109 countries located in the tropics. In Europe, malaria has been eradicated except in Azerbaijan, Georgia, Kyrgyzstan, Tajikistan and Turkey. It is estimated that 25-30 million people travel annually from Europe to areas of malaria transmission. In Portugal malaria remained endemic until about 1950 and in recent decades, the increasing volume of international travel, particularly to tropical destinations, endemic for this disease, also led to the increase in cases. Its transmission is caused by some species of *Anopheles* mosquitoes. Severe *Plasmodium falciparum* malaria, including cerebral malaria, severe malarial anemia and placental malaria remain an important cause of morbidity and mortality.

The aim of this study is to analyse the profile of anti-*Plasmodium falciparum* antibodies and proinflammatory cytokines in individuals with clinical suspicion of malaria who were in different endemic regions of Africa, including Angola, Mozambique, Guinea, Sao Tome and Principe, Gabon and Congo. It is known that in endemic regions natural acquired immunity against *P. falciparum* malaria is mediated by antibodies of the IgG type. Through enzyme immunoassays (*ELISA*) the population with and without serological reactivity to anti-*P.falciparum* antibodies was distinguished, compared to a control group (sera from healthy patients from Portugal, who had never been in endemic areas for malaria). The *ELISA* method was used to determine the levels of total antibody anti-*Plasmodium falciparum* IgG, IgM, IgG1, IgG3 and IgG4 and the serum concentration of pro-inflammatory cytokines C5a of the complement system, C-reactive protein (CRP) and IFN- $\gamma$ .

Out of one hundred thirty-two samples studied, sixty-five were classified as positive for *Plasmodium spp.* The main clinical manifestations were fever, headache and myalgia. Only forty samples were classified as positive for *P. falciparum*. In this group of patients there was an increase in the assayed inflammatory mediators, including total IgG, IgG1, IgG3, and IgM anti -*P. falciparum*, C5a, CRP and IFN- $\gamma$ .

The intention of this study was to contribute to a better understanding of the pathophysiological mechanisms of imported malaria.

**Keywords:** Malaria, *Plasmodium falciparum*, cytokines, *ELISA*, anti-*P.falciparum* antibodies.



## ÍNDICE

<i>Dedicatória</i> .....	i
AGRADECIMENTOS .....	ii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS .....	viii
1. Introdução .....	1
1.1 Malária: Aspetos históricos, distribuição, epidemiologia .....	1
1.2 O parasita: ciclo de vida e biologia parasitária do <i>Plasmodium spp.</i> .....	5
1.3 Aspetos clínicos e Imunopatológicos da malária.....	11
1.4 Imunologia da malária.....	16
1.5 Medidas de controlo da malária.....	33
1.6 Diagnóstico Laboratorial .....	34
1.7 Terapêutica da malária e suas limitações .....	38
2. Objetivos .....	42
2.1 Objetivo Geral .....	42
2.2. Objetivos Específicos.....	42
3. Material e Métodos.....	44
3.1 População de estudo.....	44
3.2 Obtenção de dados laboratoriais .....	45
3.3 Tratamento de amostras sanguíneas para ensaios imunoenzimáticos.....	45
3.3.1 Parasitas ( <i>Plasmodium falciparum</i> ).....	46
3.3.2 Cultura <i>in vitro</i> de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	46
3.3.3 Extração e quantificação das proteínas totais de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	47
3.4 Determinação de anticorpos totais anti- <i>Plasmodium spp.</i> em pacientes com quadro clínico suspeito de malária .....	47
3.5 Determinação de anticorpos do tipo IgM e IgG específicos para <i>Plasmodium falciparum</i> .....	49
3.6 Determinação de anticorpos IgG1, IgG3 e IgG4 anti- <i>Plasmodium falciparum</i> ....	51
3.7 Determinação das proteínas solúveis C5a e CRP .....	52
3.8 Determinação da citocina pro-inflamatória IFN- $\gamma$ .....	54
4. Resultados e Discussão.....	55

4.1 Características sociodemográficas .....	56
4.2 Apresentação clínica da população estudada .....	58
4.3 Avaliação dos dados hematológicos .....	58
4.4 Determinação de anticorpos totais anti- <i>Plasmodium spp.</i> em pacientes com quadro clínico suspeito de malária .....	61
4.5 Determinação de anticorpos do tipo IgM e IgG específicos para <i>Plasmodium falciparum</i> .....	64
4.6 Determinação de subtipos de anticorpos anti- <i>Plasmodium falciparum</i> .....	69
4.7 Determinação das proteínas solúveis C5a e CRP .....	73
4.8 Determinação citocina pro-inflamatória IFN- $\gamma$ .....	79
5. Conclusões e Perspetivas .....	83
6. Referências Bibliográficas .....	85
ANEXOS .....	94

## LISTA DE ABREVIATURAS

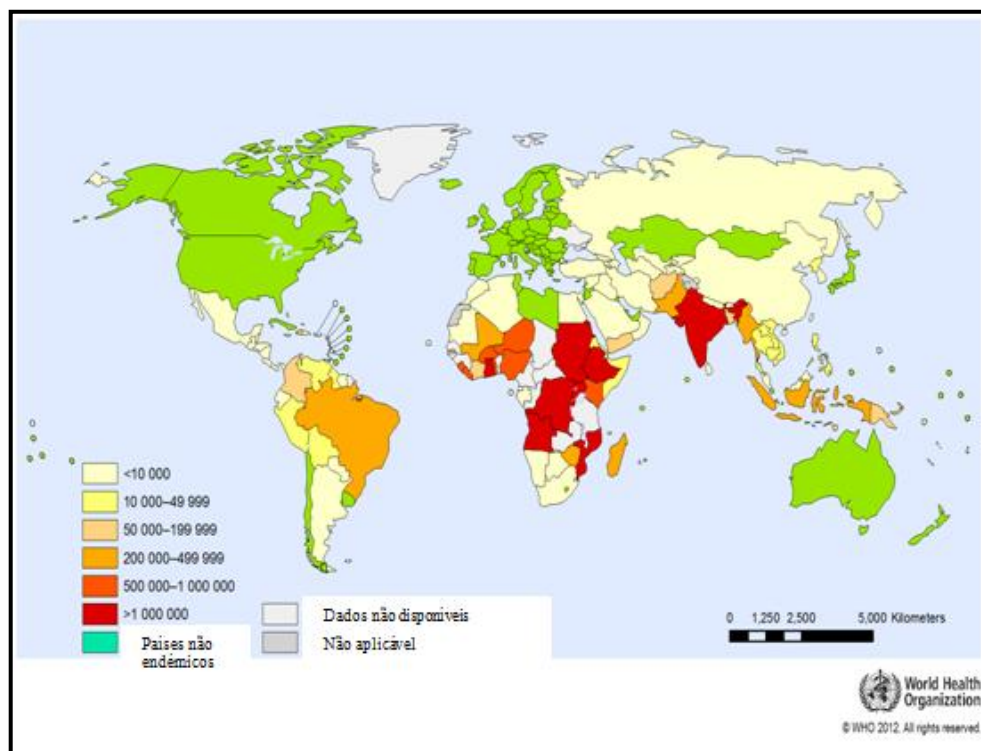
AMS	Anemia por Malária Severa
ACTs	Terapias combinadas à base de artemisinina
cAMP	Adenosina 3'5'-monofosfato cíclico
CSA	Condroitina A
DBL	<i>Duffy Binding Like</i>
DMM	Células Dendríticas, Monócitos e Macrófagos
EI	Eritrócito Infetado
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
GPI	<i>Glycosylphosphatidylinositol</i>
ICAM 1	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
IFN	Interferão
IgA	Imunoglobulina A
Ig E	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-1	Interleucina
MC	Malária Cerebral
MP	Malária Placentária
ON	Óxido Nítrico
PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
PfEMP1	<i>P. falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1</i>
<i>P. knowlesi</i>	<i>Plasmodium knowlesi</i>
<i>P. malariae</i>	<i>Plasmodium malariae</i>

<i>P.ovale</i>	<i>Plasmodium ovale</i>
<i>P. vivax</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
RBL	<i>Reticulocyte Binding Like</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
TDR	Teste de diagnóstico rápido
TLR	Recetores <i>toll-like</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TRAP	<i>Trombospondin Related Adhesive Protein</i>
VCAM 1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i>
VA	Via alternativa do complemento
VC	Via clássica do complemento
VL	Via por lectina do complemento

## 1. Introdução

### 1.1 Malária: Aspectos históricos, distribuição, epidemiologia

A malária uma doença potencialmente fatal, endêmica em 109 países localizados ao longo dos trópicos. Em África predomina o parasita *Plasmodium falciparum*, tal como na Papua Nova Guiné e Haiti, enquanto o *Plasmodium vivax* é mais comum na América Central e certas zonas da América do Sul, norte de África, Médio Oriente, e subcontinente Indiano. A prevalência de ambas as espécies é aproximadamente igual em outras partes da América do Sul, sudeste da Ásia e Oceânia (Figura 1) (Cook & Zumla, 2009).



**Figura 1:** Número de casos reportados e confirmados de malária (2010). Adaptado de (OMS, 2012).

Na Europa, a malária foi erradicada exceto no Azerbaijão, Geórgia, Quirguistão, Tadjiquistão e Turquia (Europe, 2014). Estima-se que 25-30 milhões de pessoas viajem anualmente da Europa para áreas com transmissão de malária. A malária importada para

a Europa é vista em viajantes ou retorno de emigrantes provenientes de áreas endémicas e em imigrantes que vivem na Europa retornados de uma visita a amigos e parentes (Askling, *et al.*, 2012).

Em Portugal a malária permaneceu endémica até cerca de 1950, em particular nas bacias dos rios Mondego, Sado e Águeda, altura em que foi erradicado o vetor. No entanto, devido às migrações populacionais entre Portugal e os países de língua oficial Portuguesa situados em regiões endémicas, nomeadamente Angola, Moçambique, Guiné, São Tomé e Príncipe e Timor, a malária, na sua forma importada, continua a aparecer de forma esporádica em Portugal (Tabela 1). Nas últimas décadas, o aumento do volume de viagens internacionais, nomeadamente para destinos tropicais, endémicos para esta doença, acarretaram também o possível aumento dos casos (Palma Dos Reis, *et al.*, 2012).

**Tabela 1:** Número de casos importados de malária por *P.falciparum* em Portugal entre 2003 e 2014. Adaptado de (Europe, 2014).

Número de casos importados de malária em Portugal (2003-2014)												
Anos	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
<b>Portugal</b>	32	32	36	28	34	30	31	-	-	47	-	-

Ano	País	
-	-	As células em branco indicam dados indisponíveis ou que ainda não foram reportados à OMS

A sua transmissão é feita por algumas espécies de mosquitos *Anopheles*. A transmissão da malária não ocorre a temperaturas abaixo dos 16°C, ou acima dos 33°C e a altitudes acima dos 2000 m porque desta forma o desenvolvimento no mosquito (esporogonia) não acontece. As condições ótimas para a transmissão incluem um alto índice de humidade e uma temperatura entre os 20 e os 30°C. A malária é frequentemente sazonal, coincidindo com a época das chuvas o que providencia ao mosquito água para a sua respiração e o aumento de níveis de humidade favorecendo a sua sobrevivência (Cook & Zumla, 2009).

Existem formalmente nomeadas 462 espécies de *Anopheles*. Destes, cerca de 70 têm demonstrado ser vetores competentes para malária humana (Hay, *et al.*, 2010). A intensidade da transmissão da malária varia de baixa (em média uma picada infecciosa por pessoa a cada 10 anos) a extremamente alta (três picadas infecciosas por pessoa por dia). A transmissão da malária ao homem depende de vários fatores interligados. O mais importante pertence ao vetor, o mosquito *Anopheles*, em particular à sua longevidade.

Dado que o desenvolvimento do esporozoítio parasita no vetor ocorre em aproximadamente uma semana, para haver transmissão de malária o mosquito tem que sobreviver por mais do que esse período depois de ingerir o gametócito transportado por um humano. Existe também uma variação considerável na capacidade dos mosquitos *Anopheles* para transmitir a malária (capacidade vetorial). Cada vetor tem os seus padrões de comportamento e mesmo entre a mesma espécie pode variar segundo áreas geográficas (Cook & Zumla, 2009). Existem três espécies endémicas em África de mosquitos altamente especializados que dependem quase exclusivamente de seres humanos (*A. funestus* e *A. gambiae*), ou do seu gado (*A. arabiensis*). Estas espécies de vetores podem mediar os níveis de transmissão da malária (Killeen, *et al.*, 2013). Em Portugal, num estudo com amostragem abrangente de todo o território português, foram reportadas larvas de *A. Atroparvus* (transmissoras de malária humana) encontradas mais frequentemente em habitats expostos ao sol, embora "com um pouco de sombra fornecida por gramíneas e vegetação aquática" (Bangs, *et al.*, 2010).

O comportamento humano tem também um importante papel na epidemiologia da malária. É necessário haver um reservatório humano ou gametócitos viáveis para a transmissão da infeção. Em áreas de grande transmissão, as crianças e jovens são mais suscetíveis á malária do que as crianças mais velhas imunes e adultos. A densidade parasitária é mais alta e a gametocitémia é detetada mais frequentemente em crianças. Em áreas que são holoendémicas ou hiperendémicas para *P.falciparum*, tal como a maior parte da África tropical ou costa da Nova Guiné, as pessoas são infetadas repetidamente durante as suas vidas. Existe uma morbilidade e mortalidade consideráveis durante a infância. As infeções de malária por *P.falciparum* são mais severas em grávidas e parecem aumentar devido ao suplemento de ferro (Cook & Zumla, 2009).

A malária severa por *Plasmodium falciparum*, incluindo malária cerebral (MC), anemia por malária severa (AMS) e malária placentária (MP), continua a ser uma importante causa de morbidade e mortalidade materna e infantil (Silver, *et al.*, 2010). É difícil precisar quantas pessoas morrem por ano de malária dado que a doença é mais prevalente em países onde os serviços de saúde são deficientes. Estima-se que em 2010 tenham ocorrido 219 milhões de casos de malária (num intervalo entre 154 e 289 milhões) e 660 000 mortes (de 610 000 a 971 000). As estimativas para 2010 foram atualizadas na sequência de uma consulta aos países, após uma primeira publicação no Relatório Mundial do Paludismo 2011. As estimativas país a país disponíveis para 2010, mostram que 80% das mortes estimadas por malária ocorreram apenas em 14 países e que 80% dos casos estimados ocorreram em 17 países. Em conjunto, a República Democrática do Congo e a Nigéria assumem mais de 40% do total mundial de mortes. Estima-se que 40% do número total dos casos de malária ocorram na República Democrática do Congo, na Índia e na Nigéria (OMS, 2012). A formação de sistemas de vigilância demográficos estandardizados em muitas áreas endêmicas para malária resultará em dados e medidas mais precisas do impacto de determinadas intervenções (Cook & Zumla, 2009). Os países com um número mais elevado de casos têm dificuldade em fornecer dados fiáveis, pelo que é necessário recorrer a estimativas para deduzir tendências. Os números estimados de casos e de mortes por malária contêm um elevado grau de incerteza, o que não impede que se conclua que as reduções na incidência e na mortalidade tenham ocorrido mais rapidamente nos países que inicialmente tinham um menor número de casos e de mortes. Não obstante, um crescente número de casos e de mortes foi evitado entre 2001 e 2010 nos países em que o paludismo tinha um maior peso em 2000. Se as taxas de incidência e de mortalidade por malária do ano 2000 se tivessem mantido inalteradas ao longo da década, entre 2001 e 2010 teriam ocorrido mais 274 milhões de casos e um milhão e cem mil mortes por malária. A maioria dos casos evitados (52%) e das vidas poupadas (58%) foram-no nos 10 países com uma estimativa de maior peso de malária em 2000. Consequentemente, os programas contra a malária tiveram o seu maior impacto nos países de maior incidência da doença (OMS, 2012).



## 1.2 O parasita: ciclo de vida e biologia parasitária do *Plasmodium spp.*

Como todos os parasitas do Filo Apicomplexa, a que pertence, o *Plasmodium spp.* é um parasita intracelular obrigatório, contendo três elementos genéticos: o núcleo, o genoma mitocondrial e o ADN extra-cromossômico circular. O genoma de *P. falciparum* é constituído por cerca de 5300 genes em 14 cromossomas, desconhecendo-se a função de cerca de 60% das proteínas codificadas (Gardner, *et al.*, 2002).

O *Plasmodium falciparum* e, com uma extensão muito menor, o *Plasmodium vivax* são as principais causas de doença e morte por malária (Miller, *et al.*, 2002). O ciclo de vida do *P. falciparum* em seres humanos inclui a fase pré-eritrocitária, que inicia a infeção, a fase eritrocitária assexuada, que causa a doença, e a fase de gametócitos, que infecta os mosquitos que transmitem o parasita. O ciclo pré-eritrocitário começa quando um mosquito *Anopheles* fêmea inocula um pequeno número de esporozoítos de *P. falciparum* na pele ou diretamente na corrente sanguínea. Os esporozoítos viajam para o fígado e infetam um pequeno número de hepatócitos. Um único esporozoíto dá origem a dezenas de milhares de parasitas assexuados denominados de merozoítos. Os merozoítos são liberados na corrente sanguínea cerca de uma semana após a infeção inicial no fígado, quando os hepatócitos infetados “rebentam” (Figura 2) (Crompton, *et al.*, 2010). O processo de invasão envolve proteínas de superfície do esporozoíto, como domínios de trombospondina na proteína circunsporozoítica (CSP) e a proteína relacionada à TRAP (do inglês *Thrombospondin-Related-Adhesive-Protein*), bem como moléculas de superfície do hospedeiro vertebrado. A CSP reveste toda a membrana plasmática do esporozoíto e alguns dos seus domínios ligam-se aos proteoglicanos sulfato de heparina (HSPG), que se projetam no endotélio sinusoidal dos hepatócitos, bem como às células de *Kupffer* (Vaughan, *et al.*, 2008; Stefan, *et al.*, 2003). Dentro do hepatócito, cada esporozoíto desenvolve-se em milhares de merozoítos, em que cada um pode invadir um eritrócito. A doença começa apenas quando o parasita assexuado se multiplica nos eritrócitos. A fase pré-eritrocitária costuma ser assintomática (Lindner, *et al.*, 2012). Nas infeções por *P. vivax* e *P. ovale* uma parte dos parasitas hepáticos têm a capacidade de se manterem inertes, como hipnozoítos, podendo mais tarde causar recaídas, que caracterizam as infeções por estas duas espécies (Greenwood, *et al.*,

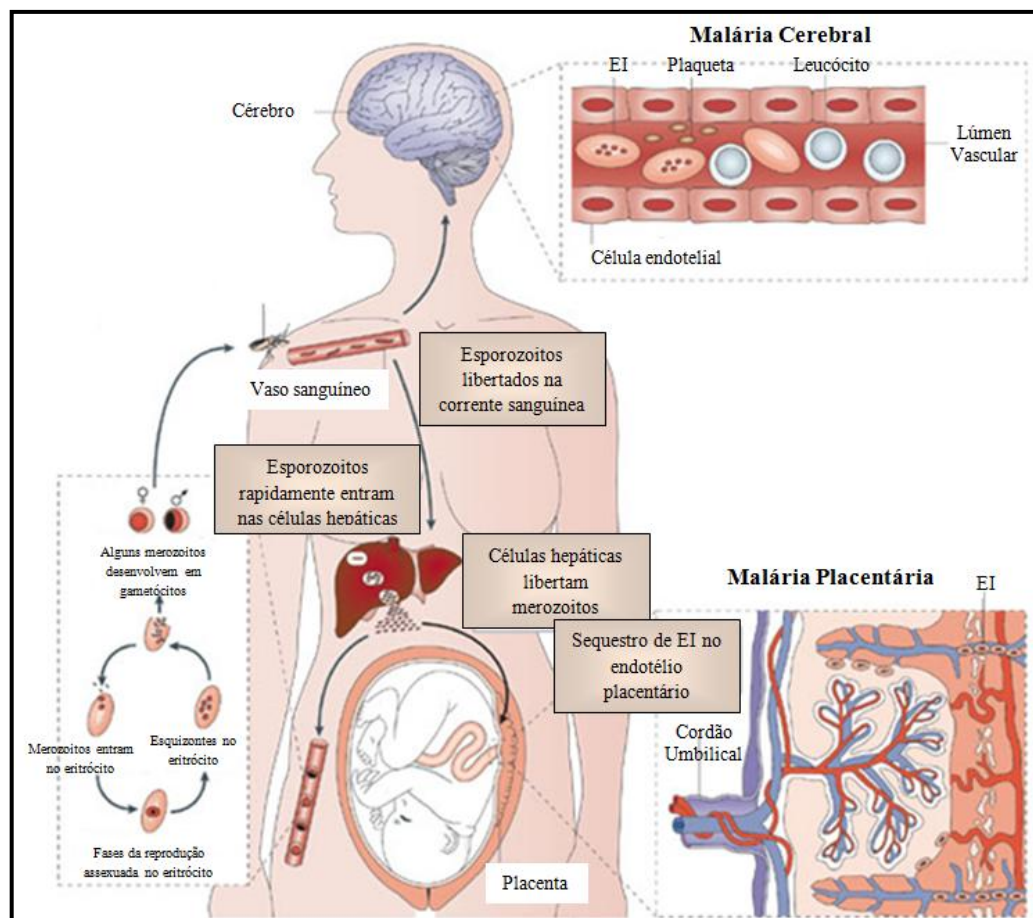
2008). O *P. malariae* não forma hipnozoítos, mas pode persistir durante décadas como formas sanguíneas infecciosas assintomáticas (Greenwood, *et al.*, 2008).

O *Plasmodium falciparum* e o *P. vivax* desenvolvem-se ao longo de 48 horas nos eritrócitos, produzindo cerca de 20 merozoitos por parasita maduro, com cada merozoito capaz de invadir outro eritrócito. Uma pequena proporção de parasitas assexuados converte-se em gametócitos que são essenciais para a transmissão da infecção através do mosquito anofelino fêmea, mas não causa doença. (Miller, *et al.*, 2002). A sequência de invasão é provavelmente similar para todos os *Plasmodium spp.* O parasita tem de envolver os recetores de ligação no eritrócito e submeter-se a “reorientação apical”, formação de junção e sinalização. O parasita induz um vacúolo derivado da membrana de plasma do eritrócito e entra no vacúolo por movimentação na junção. Três organelos no fim invasivo (complexo apical) do parasita (roptrias, micronemas e conoide) definem o filo apicomplexa (Morrisette & Sibley, 2002). Recetores que medeiam a invasão de eritrócitos por merozoitos e a invasão do fígado por esporozoitos são encontrados nos micronemas, na superfície celular e roptrias<sup>1</sup>. A localização destes recetores dentro dos organelos pode proteger o parasita de neutralização mediada por anticorpos, como a libertação de organelos apicais após contacto com o eritrócito pode limitar a sua exposição ao anticorpo (Miller, *et al.*, 2002).

Identificar as vias de sinalização que libertam o conteúdo dos organelos em contacto com o eritrócito do hospedeiro é um assunto crítico na biologia do parasita. Os parasitas da malária têm vias de sinalização intracelulares mediadas por fosfoinositídeo, cAMP (adenosina 3',5'-monofosfato cíclico), e mecanismos dependentes de cálcio (Miller, *et al.*, 2002). Os eventos de invasão incluem a libertação de moléculas essenciais dos organelos apicais e iniciam o movimento de junção actina-miosina que leva o parasita para dentro do vacúolo que forma dentro do eritrócito (Srinivasana, *et al.*, 2011).

---

<sup>1</sup> **roptrias** são estruturas glandulares produtoras de enzimas.

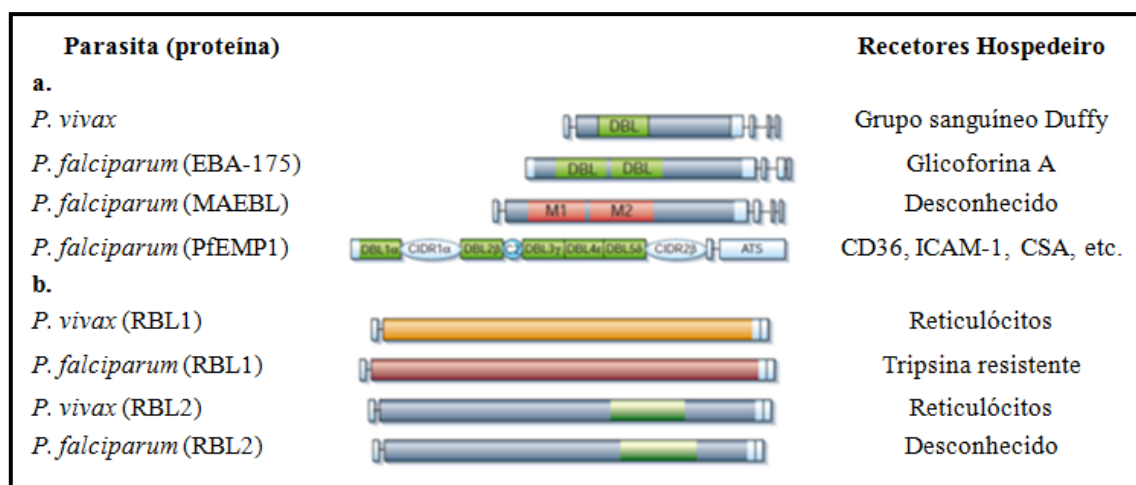


**Figura 2:** Ciclo de vida do parasita no hospedeiro e patogênese da malária por *P. falciparum*. Adaptado de (Miller, *et al.*, 2002).

Ambos, *P. falciparum* e *P. vivax*, podem provocar anemia severa, mas na maioria dos casos apenas *P. falciparum* causa complicações a nível cerebral, hipoglicémia, acidose metabólica e dificuldade respiratória. Certas diferenças na biologia dos dois parasitas explicam parcialmente as diferenças em padrões da doença. Primeiro o *P. falciparum* pode invadir uma grande percentagem de eritrócitos, enquanto o *P. vivax* está limitado aos reticulócitos (Miller, *et al.*, 2002). A segunda diferença é a surpreendente redundância das vias de invasão no *P. falciparum* quando comparado com *P. vivax*. Este último parasita invade apenas eritrócitos do grupo sanguíneo Duffy positivo e está largamente limitado aos reticulócitos. Na África Ocidental, onde os eritrócitos são principalmente do grupo sanguíneo Duffy negativo, o *P. vivax* praticamente desapareceu. As limitações de invasão do *P. vivax* levaram à descoberta de duas famílias de recetores de parasitas (Figura 3). Primeiro, a molécula do parasita *P. falciparum* e *P. knowlesi* que se liga ao sistema do grupo sanguíneo Duffy e proteínas homólogas DBL

(do inglês *Duffy-Binding-Like*); segundo, as proteínas ligantes ao reticulócito do parasita *P. vivax*, e proteínas homólogas RBL (do inglês *Reticulocyte-Binding-Like*) do *P. falciparum* e *P. yoelii*. Os vários membros das famílias DBL e RBL podem reconhecer diferentes recetores dos eritrócitos para além daqueles do grupo sanguíneo Duffy ou os recetores de reticulócitos (Miller, *et al.*, 2002).

O *Plasmodium falciparum* pode usar as suas várias vias redundantes para invadir com igual ou reduzida eficiência os eritrócitos que possuem um recetor em particular com resíduos de ácido siálico. Foram já identificadas três vias dependentes de sialoglicoproteína envolvendo eritrócitos e co-recetores do parasita: glicoforina A e a proteína DBL do parasita EBA-175 (Sim, *et al.*, 1994); glicoforina C/D e a proteína DBL do parasita BAEBL (Mayer, *et al.*, 2001); e a via resistente à tripsina envolvendo a proteína RBL do *P. falciparum*. Uma quarta via pode envolver o resíduo de ácido siálico na glicoforina B.



**Figura 3:** Duas famílias de recetores do *Plasmodium spp.* **a.** Família DBL **b.** Família RBL. Adaptado de (Miller, *et al.*, 2002).

Das tentativas de decifrar o altamente complexo e patogénico processo de adesão enfatiza-se o quanto já se aprendeu e o quão pouco se compreende. O processo de adesão do *P. falciparum*, no qual a maioria dos parasitas primeiro entra na corrente sanguínea e depois rola, antes de ficar firmemente aderido, é comparável com a adesão leucocitária. A maioria dos recetores do hospedeiro está envolvida com a corrente e

rolamento mas incapazes de suportar por si mesmos uma adesão firme sob a corrente sanguínea. (Miller, *et al.*, 2002). Apenas dois recetores, CD36 e CSA providenciam aderência estacionária estável (Davis, *et al.*, 2011).

Os parasitas sequestram-se a si próprios nos vários órgãos incluindo coração, pulmões, cérebro, fígado, rins, tecido subcutâneo e placenta. As várias células endoteliais nestes órgãos e os sinciciotrofblastos<sup>2</sup> na placenta expressam diferentes e variáveis quantidades de recetores do hospedeiro (Miller, *et al.*, 2002). Uma única proteína parasitária – PfEMP1 (do inglês *P. falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1), que é expressa na superfície de eritrócitos parasitados – medeia a ligação do parasita a todos os variados recetores. A PfEMP1 é codificada por uma larga e diversa família genética que envolve a variação antigénica clonal e tem um papel central na patogénese do *P. falciparum*. O domínio da múltipla adesão localizado na região extracelular da PfEMP1 pode simultaneamente reconhecer diversos recetores do hospedeiro (Normark, *et al.*, 2007; Pasternak & Dzikowski, 2009).

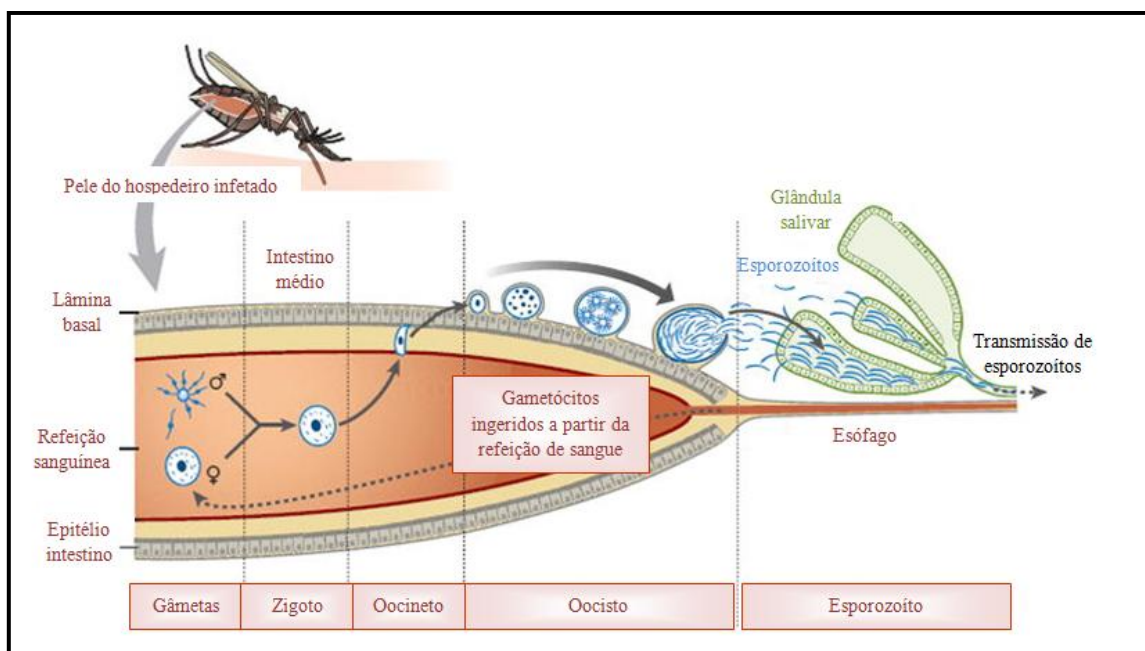
Aproximadamente 36 horas após invasão pelos merozoítos, acontecem múltiplas divisões nucleares, levando à formação do esquizonte. Logo após, há a rotura dos eritrócitos, com saída de 6 a 36 merozoítos, e subsequente destruição dos eritrócitos restantes. Os merozoítos libertados, reinvadem rapidamente outros eritrócitos e começam um novo ciclo assexuado. No entanto, apenas uma subpopulação de eritrócitos pode ser invadido. O ciclo assexuado é de aproximadamente 48h para *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale* e 72 h para *P. malariae*, causando um aumento rápido do número de parasitas até  $10^{13}$  por hospedeiro (Greenwood, *et al.*, 2008).

Após uma série de ciclos assexuados do *P. falciparum*, uma subpopulação de parasitas desenvolve formas sexuadas (gametócitos) que são móveis. O processo de gametogónia leva entre sete a 10 dias em *P. falciparum*. É necessário um gâmeta masculino (contendo oito micro gâmetas) e um feminino (macro gâmeta) para que a infeção ocorra (Baker, 2010). Após a ingestão do sangue pela fêmea do mosquito *Anopheles*, os

---

<sup>2</sup> **sinciciotrofblasto** é uma camada de células embrionárias sinciciais originada dos trofblastos, que tem como função abrir caminho na parede do endométrio para a implantação do blastocisto durante a primeira semana de gestação.

gametócitos masculinos e femininos ficam ativos no intestino do mosquito (Aly, *et al.*, 2009). Existe a fusão e a meiose, levando à formação do zigoto. Dentro de 24h, o zigoto adquire mobilidade (oocineto) e penetra a parede do estômago do mosquito, onde enquista (oocisto). O oocisto rompe-se finalmente, libertando uma miríade de esporozoítos na cavidade celômica do mosquito (Figura 4). Os esporozoítos migram para as glândulas salivares, esperando a inoculação na próxima alimentação pelo mosquito (Aly, *et al.*, 2009; Cox, 2010). O mosquito torna-se infeccioso para o seu próximo hospedeiro duas semanas após a ingestão dos gametócitos, período de tempo que é influenciado pela temperatura externa (Greenwood, *et al.*, 2008). O desenvolvimento de *P. vivax* dentro do mosquito, pode ocorrer a temperaturas mais baixas do que a necessária para o desenvolvimento de *P. falciparum*, o que explica a preponderância das infecções por *P. vivax* fora das regiões tropicais e subtropicais (Greenwood, *et al.*, 2008).



**Figura 4:** O parasita *Plasmodium* spp. sofre reprodução sexuada uma vez durante um ciclo de vida, e esta ocorre no mosquito. Adaptado de (Aly, *et al.*, 2009).

### 1.3 Aspetos clínicos e Imunopatológicos da malária

A apresentação clínica da malária é muito variável, podendo apresentar desde casos pauci-sintomáticos<sup>3</sup> até formas agudas e muito graves, as quais se encontram sistematizadas na tabela 2 (Palma Dos Reis, *et al.*, 2012). O ciclo eritrocitário representa o único estágio do ciclo de vida da malária que é responsável pelas manifestações clínicas da doença (Warrell, *et al.*, 1990). O conhecimento existente em relação aos mecanismos patológicos que estão na base das formas não complicadas e complicadas da malária são limitados (Crawley, *et al.*, 2010).

**Tabela 2:** Principais manifestações clínicas da malária grave apresentadas separadamente de acordo com os sistemas fisiológicos por sistemas. Adaptado de (Palma Dos Reis, *et al.*, 2012).

<b>SNC</b>	Malária Cerebral (coma, convulsões)
<b>Metabólico</b>	Hipoglicémia (particularmente nas crianças) Acidose metabólica
<b>Renal</b>	Hemoglobinúria sem hematúria Oligúria Urémia (Necrose tubular aguda)
<b>Gastrointestinal</b>	Diarreia Icterícia
<b>Hematológico</b>	Anemia grave (hemólise e eritropoiese ineficaz) Coagulação Intravascular Disseminada Rutura do baço
<b>Respiratório</b>	Síndrome de Dificuldade Respiratória do Adulto
<b>Outras</b>	Hiperpirexia Choque

Milhares de crianças morrem de malária em África todos os anos. Mas as manifestações clínicas da infeção dependem de muitos fatores (Figura. 5). Estes fatores, geralmente definidos pelo próprio doente, determinam a manifestação da doença em cada

<sup>3</sup> **Pauci**, do latim “paucus”, é um termo de composição ortográfica que exprime a ideia de “pouco”.

hospedeiro. A prioridade de topo deve ser a prevenção devido à inabilidade de acesso às condições ótimas de tratamento e a cada vez mais envolvente capacidade de resistência a drogas (Miller, *et al.*, 2002).

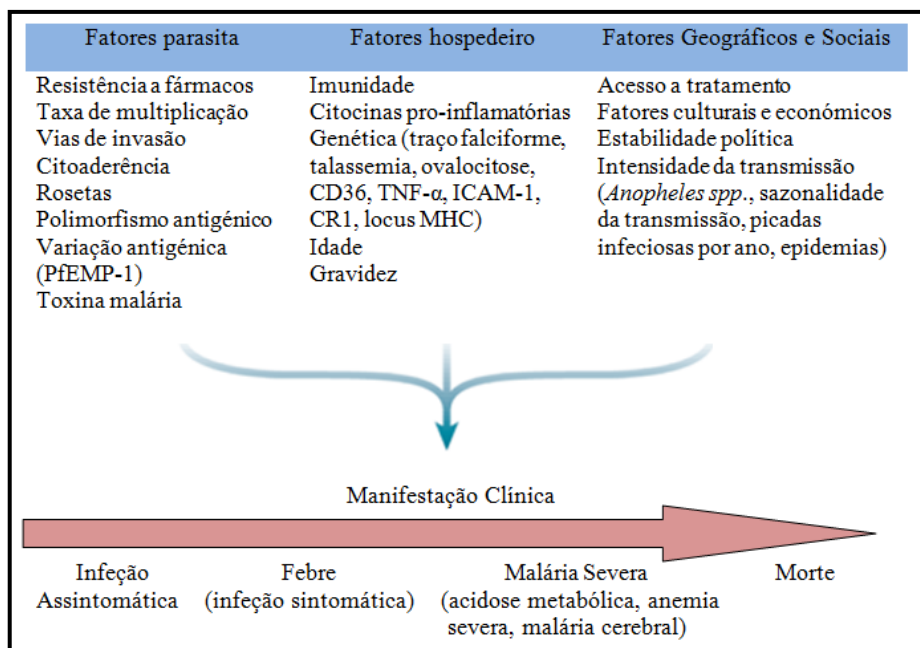
Uma das principais características do hospedeiro, que afeta a gravidade da doença, é a presença de distúrbios genéticos e metabólicos dos eritrócitos, nomeadamente anemia de células falciformes, talassémia e défice de glicose-6-fosfato desidrogenase, que conferem proteção contra a malária grave (Fortin, *et al.*, 2002).

Na maioria dos casos, a ligação ao endotélio do hospedeiro não leva à patogénese, sendo que a maioria das infeções resulta numa malária desprovida de complicações. O que causa a transição de malária não complicada para uma séria infeção, tal como malária cerebral, não é bem claro presentemente. Uma intrigante possibilidade é a de que a expressão de propriedades de uma ligação em particular conduza a padrões de consequências patogénicas e de sequestro. Os eritrócitos contendo formas maduras de *P. falciparum* aderem ao endotélio microvascular, processo também chamado de citoaderência, e desaparecem da circulação, causando obstrução à perfusão dos tecidos (Ho & White, 1999). Este processo é conhecido como sequestração (Sherman, *et al.*, 1992).

Outro fenómeno que caracteriza a fisiopatologia da malária é a formação de rosetas, que resulta da ligação de eritrócitos não infetados a eritrócitos infetados pelo parasita da malária. Até à data, foram identificados cinco recetores da formação de rosetas nos eritrócitos: os antigénios do grupo sanguíneo A e B, CD36, o recetor do complemento 1 (CR1) e *HS-like GAGs* (Chen, *et al.*, 2000).

A citoaderência, a formação de rosetas, a agregação plaquetária e a aglutinação levam à obstrução da microcirculação na malária por *P. falciparum* (Rowe, *et al.*, 2009). A citoaderência tem como consequência a ativação do endotélio vascular, a disfunção endotelial, que em conjunto com a redução do substrato em oxigénio, levam a glicólise anaeróbica, acidose láctica e disfunção celular (Dondorp, *et al.*, 2004).





**Figura 5:** A manifestação clínica da infeção por malária mediante os diversos fatores geográficos, sociais, do parasita e hospedeiro (Miller, *et al.*, 2002).

O sequestro dos parasitas no cérebro pode estar relacionado com a malária cerebral e pode envolver o recetor ICAM-1 (do inglês *Intercellular Adhesion Molecule 1*) (Bengtsson, *et al.*, 2013). Embora os eritrócitos infetados estejam ligados ao endotélio cerebral no momento da autópsia, desconhece-se se este facto representa uma distribuição de adesão diferente da malária não complicada. Um aumento da expressão de ICAM-1 no endotélio cerebral pode explicar certas diferenças na adesão do parasita na malária cerebral. O papel do sequestro noutras complicações mais severas da malária permanece incerto.

A doença também difere clinicamente com a idade, imunidade e grau de transmissão. A imunidade contra a malária tem um papel importante no controlo e patogénese da doença. As propriedades da PfEMP1 como proteína de adesão (para evitar a destruição do parasita no baço) não podem ser separadas do seu envolvimento na invasão imune por variação antigénica clonal, a qual pode levar à infeção crónica (Penman & Gupta, 2008). Mesmo depois de muitas exposições, os humanos não são refratários aos parasitas da malária mas desenvolvem proteção clínica que previne da doença

sintomática. Este tipo de imunidade limita a doença e, embora o indivíduo tenha uma baixa carga parasitária, não desenvolve para uma infecção sintomática.

A proteína PfEMP1 está envolvida na evasão imune, pela variação antigénica clonal que poderá levar à infecção crónica (Hughes, *et al.*, 2010). Existe evidência que sugere que a expressão de subgrupos particulares de genes *var* poderá estar associada a diferentes resultados da doença (Normark, *et al.*, 2007). Durante o desenvolvimento da imunidade, particularmente durante o início da infância, uma estirpe específica de anticorpos para PfEMP1 são importantes na prevenção da infecção com isolados previamente encontrados. Por isso, a exposição a formas patogénicas de *P. falciparum* podem proteger contra estes parasitas, levando á seleção de possíveis parasitas menos virulentos em infecções subsequentes. Apesar da sua variação, as regiões da PfEMP1 estão restritas por função (por exemplo, ligação a CD36 e CSA) e estas regiões podem ser potenciais alvos para vacinas. A adesão do parasita também pode afetar o endotélio por indução do bloqueio do sinal de transdução mediado por recetores do hospedeiro como o CD36 (Miller, *et al.*, 2002).

Teorias correntes da patogénese da malária severa por *P. falciparum* incluem um papel para (i) respostas inflamatórias excessivas e desreguladas à inflamação, (ii) ativação endotelial, incluindo uma supra-regulação na adesão endotelial de moléculas, libertação de mediadores angiogénicos e disrupção da integridade endotelial e (iii) ativação das cascatas de coagulação e outros processos que contribuem no bloqueio mecânico e sequestro de eritrócitos parasitados ao endotélio microvascular (Rogerson, *et al.*, 2007; Schofield & Grau, 2005).

Juntos, estes mecanismos podem resultar no ferimento vascular de um órgão específico, característico da malária severa. No cérebro, estes mecanismos levam a um fluxo sanguíneo vascular alterado e hipoxia tecidual, um aumento da permeabilidade vascular, disfunção da barreira hematoencefálica e lesão neuronal, e contribui para as características clínicas da MC, incluindo coma e prejuízos neurológicos. Embora a produção de citocinas pró-inflamatórias seja importante na resistência ao *Plasmodium*, por vezes, a sua produção acaba por mediar os efeitos patogénicos deste parasita. É o

caso da produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos estimulados por *P.falciparum* que tem um papel determinante no estabelecimento das lesões inflamatórias que ocorrem no cérebro de doentes com malária cerebral (Arosa, *et al.*, 2007).

Ao longo dos últimos anos tem havido várias mudanças chave na compreensão do que constitui a malária severa e que definem o assunto na patogénese que necessita de ser explorada para desenvolver melhores tratamentos. A primeira mudança está no aumento do reconhecimento de que a malária é uma doença que afeta vários tecidos e órgãos, mesmo quando as manifestações mais marcadas pareçam envolver um único órgão como o cérebro. Em particular, a acidose metabólica, frequentemente profunda, tem sido reconhecida como a principal característica fisiopatológica “que atravessa” os sintomas clássicos clínicos de malária cerebral e anemia por malária severa (Zougbedé, *et al.*, 2011). É o mais importante determinante de sobrevivência e encaminha diretamente para um comum, mas previamente pobremente reconhecido síndrome de desconforto respiratório. A destruição de eritrócitos é também uma parte inevitável na malária, com consequente anemia e compromisso na entrega de oxigénio (Perkins, *et al.*, 2011). A segunda e relacionada mudança na conceção de malária severa é a perceção de que não há uma correlação direta entre os sintomas clínicos e o processo patogénico. Assim, a anemia severa pode surgir de muitos mecanismos pobremente compreendidos incluindo a hemólise aguda de eritrócitos não infetados e eritropoiese ineficaz (Perkins, *et al.*, 2011), assim como através da interação da infeção por malária com outras infeções parasitárias e estados nutricionais deficientes. Para muitas crianças gravemente doentes um modelo simples de “um agente patogénico/uma doença” não é adequando, pois uma coinfeção causada por agentes comuns pode estar presente com a malária severa e pode ser um fator de mortalidade (Brooker, *et al.*, 2007).

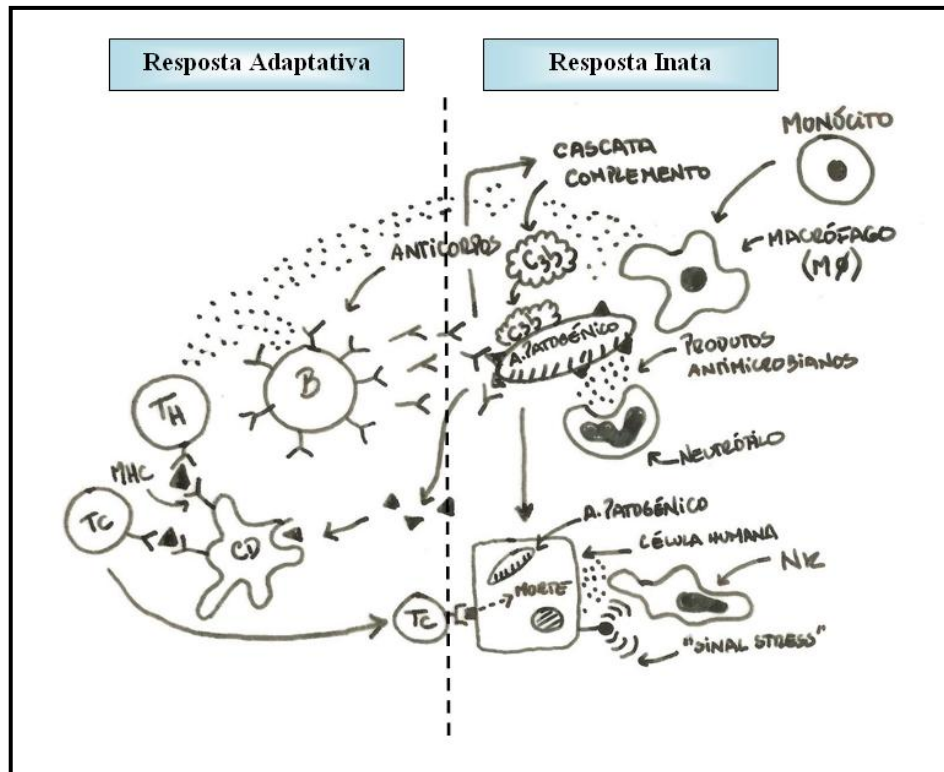
A malária severa é complexa e provavelmente não pode ser representada por um único esquema isolado; contudo, a compreensão da via corrente na qual vários processos patogénicos chave se combinam para causar a severidade da doença invoca vários processos básicos: rápida expansão de eritrócitos infetados, destruição de eritrócitos infetados e não infetados, obstrução microvascular, e processos inflamatórios que juntos

levam a uma reduzida perfusão tecidual. Isto, por sua vez, pode levar a eventos danosos a nível celular que vão exacerbar esta situação (Miller, *et al.*, 2002).

#### 1.4 Imunologia da malária

A imunidade inata é garantida por mecanismos e processos fisiológicos. O suporte do seu funcionamento apoia-se nos seguintes fatores: (i) papel desempenhado pelos fatores mecânicos, químicos e fisiológicos; (ii) papel desempenhado pelas células fagocíticas; (iii) papel dos fatores humorais; (iv) papel das células linfocíticas; (v) papel de células dendríticas, mastócitos e basófilos (Figura 6).

O parasita *Plasmodium spp.* pode ativar diversos mecanismos de resposta imune no hospedeiro. No seu conjunto, são habitualmente referidos como “imunidade inata”. Deste ramo do sistema imune fazem parte fatores presentes na circulação, designados humorais, como por exemplo proteínas do sistema complemento, anticorpos pré-formados, ditos “naturais”, ou proteínas de fase aguda (como a Proteína C Reativa). Da imunidade inata faz parte também a atividade de células como fagócitos, que reconhecem padrões moleculares característicos de microrganismos ou PAMP (do inglês *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) através de recetores de superfície ou intracitoplasmáticos, designados por PRR (do inglês *Pattern Recognition Receptors*). A ligação destes recetores desencadeia a ativação das células que os expressam e a sua função efetora. Para além destes mecanismos inatos, de especificidade alargada, o sistema imune dispõe também de mecanismos de defesa que envolvem moléculas de região variável, distribuídas clonalmente à superfície de células linfocitárias B e T, que conferem um carácter específico à resposta imune (Arosa, *et al.*, 2007).



**Figura 6:** Esquema representativo das respostas imune e adaptativa. Um agente patogénico (ex. parasita) apresenta proteínas no seu exterior. Das várias células envolvidas neste processo, temos os neutrófilos. Estes libertam vários mediadores químicos para tentar eliminar o parasita enquanto os macrófagos são “alertados” pelos monócitos em circulação. Também em circulação, existem proteínas que são atraídas pelo parasita. O C3b é talvez o mais importante. Estas aderem à superfície do parasita causando uma série de eventos denominados por sistema complemento. Caso o parasita consiga invadir com sucesso uma célula, a mesma envia “sinais de stress” que atraem as células NK ou *Natural Killer* que libertam uma série de produtos citotóxicos que incentivam a morte celular, o que acaba por inviabilizar o parasita. Outra forma de prevenir a penetração celular do parasita é a ação dos anticorpos que são produzidos por células B. Quando em circulação, estes aderem às proteínas de superfície do parasita e isto ligado com a cascata do complemento pode interferir com a função do parasita. Pequenas partes do parasita podem “desintegrar-se” e são ingeridas por células denominadas células dendríticas. Estas células transferem para a sua superfície moléculas, denominadas MHC. As células T (T *helper*) podem reconhecer estas moléculas e libertar produtos que permitem às células B aumentar a sua eficiência e também encorajar os macrófagos e neutrófilos a fazer o mesmo. Existem outros tipos de células T como as células T citotóxicas, que recebem sinais das células dendríticas e que procura células humanas infetadas e induzem também a morte celular. Se o parasita conseguir escapar a todos estes mecanismos, começam uma série de complicações e manifestações. Imagem do autor.

A fagocitose é um dos principais mecanismos de suporte da imunidade inata. Os principais tipos de células fagocíticas são os neutrófilos, os monócitos e os macrófagos. As células fagocíticas são dotadas de movimentos ameboides que lhes permitem migrar para fora dos vasos e deslocar-se nos tecidos. Este processo de migração, denominado diapedese, é facilitado pela existência ou pelo aparecimento das moléculas de adesão, em grande parte induzidas por fatores gerados no foco inflamatório, para o qual as células fagocíticas são atraídas por estímulos químicos de atração desencadeados pelas quimiotaxinas. Um dos importantes agentes de ação quimiotática é o componente C5a do complemento, resultante da cisão do componente C5, no decurso do processo de ativação do sistema do complemento pela via alternativa, ativação esta desencadeada, entre outros fatores, pela ação de enzimas proteolíticas libertadas no foco da inflamação (Arosa, *et al.*, 2007).

Das moléculas recetoras presentes nas membranas das células fagocíticas, algumas são estimuladas pela ligação de citocinas a moléculas recetoras da sua membrana, ligação que estimula a sua atividade fagocítica. A fagocitose pode ser mediada por recetores que se ligam diretamente aos agentes patogénicos ou pode ser mediada por opsoninas. Assim, as opsoninas são importantes mediadoras do processo conhecido por opsonização, que não é mais do que a facilitação da fagocitose. As principais opsoninas são: o fragmento C3b do complemento, importante interveniente no processo de opsonização ao ligar-se a recetores existentes à superfície das células fagocíticas (particularmente os recetores CR1 e CR2); anticorpos, dado que os microrganismos revestidos por anticorpos são facilmente abordados e ingeridos por células fagocíticas por estas terem numerosos recetores para o fragmento Fc das imunoglobulinas, particularmente da classe IgG; a proteína C reativa tem, também, um efeito opsonizante, sendo uma proteína de fase aguda que se forma no decurso das reações inflamatórias; a fibronectina, a tuftsin e os leucotrienos. Uma vez que as opsoninas principais são os anticorpos e os fragmentos do complemento, os recetores para estas moléculas têm um papel primordial na fagocitose. Como o próprio nome indica, os recetores Fc ligam-se à porção Fc das imunoglobulinas IgG, IgA e IgE. Os recetores para as IgG e para as IgA são expressos nos fagócitos, ao passo que o recetor de elevada afinidade para as IgE é expresso prioritariamente nos mastócitos e basófilos (Arosa, *et al.*, 2007).

O sistema complemento é uma rede de fase fluida e proteínas ligantes a membrana, que servem como ativadores do sistema imune inato. Como componente central da resposta imune inata, o complemento desempenha um papel crítico na neutralização de parasitas invasivos; contudo, uma ativação excessiva deste sistema tem o potencial de mediar a patogênese da doença. Um aumento da ativação do complemento é consistentemente observado em infecções por malária na população humana. Um pequeno estudo de viajantes não imunes reportou níveis significativamente baixos de C3, C4 e atividade hemolítica do complemento total (CH50) em pacientes com malária cerebral mas não em pacientes com malária não complicada (Adam, *et al.*, 1981). Contudo, poucos outros estudos examinaram a associação entre a ativação do complemento e a severidade da doença na malária humana (Silver, *et al.*, 2010).

Usando modelos murinos no contexto de malária cerebral, conseguiu avaliar-se o papel da ativação do complemento na severidade da doença. Através do bloqueio da sinalização de C5a através do recetor C5a (C5aR) por deleção genética ou tratamento por anticorpo, verificou-se a sobrevivência em ratos suscetíveis a malária cerebral (Patel, *et al.*, 2008). Estes dados implicam uma ativação excessiva do complemento na patogênese da malária cerebral experimental.

Foram descritas múltiplas vias de ativação do complemento (Figura 7). Três vias major, as vias clássica (VC), alternativa (VA) e por lectina (VL), convergem em C3, resultando na geração de produtos de ativação C3a, C5a, C3b e do terminal complexo de ataque à membrana [CAM (C5b-C9)]. Duas vias adicionais operam independentemente de C3: na via mediada por trombina, a trombina funciona como C5 convertase, clivando C5 na sua forma ativa na ausência de C3. Além disso neutrófilos e macrófagos ativados libertam proteases de serina capazes de clivar C5 (Huber-Lang, *et al.*, 2006).

Devido à convergência das vias de ativação, é difícil associar a ativação por vias específicas na infecção por malária. É provável que todas as vias possam contribuir; contudo vários estudos defendem o papel de vias específicas na ativação do complemento na infecção por malária (Silver, *et al.*, 2010).

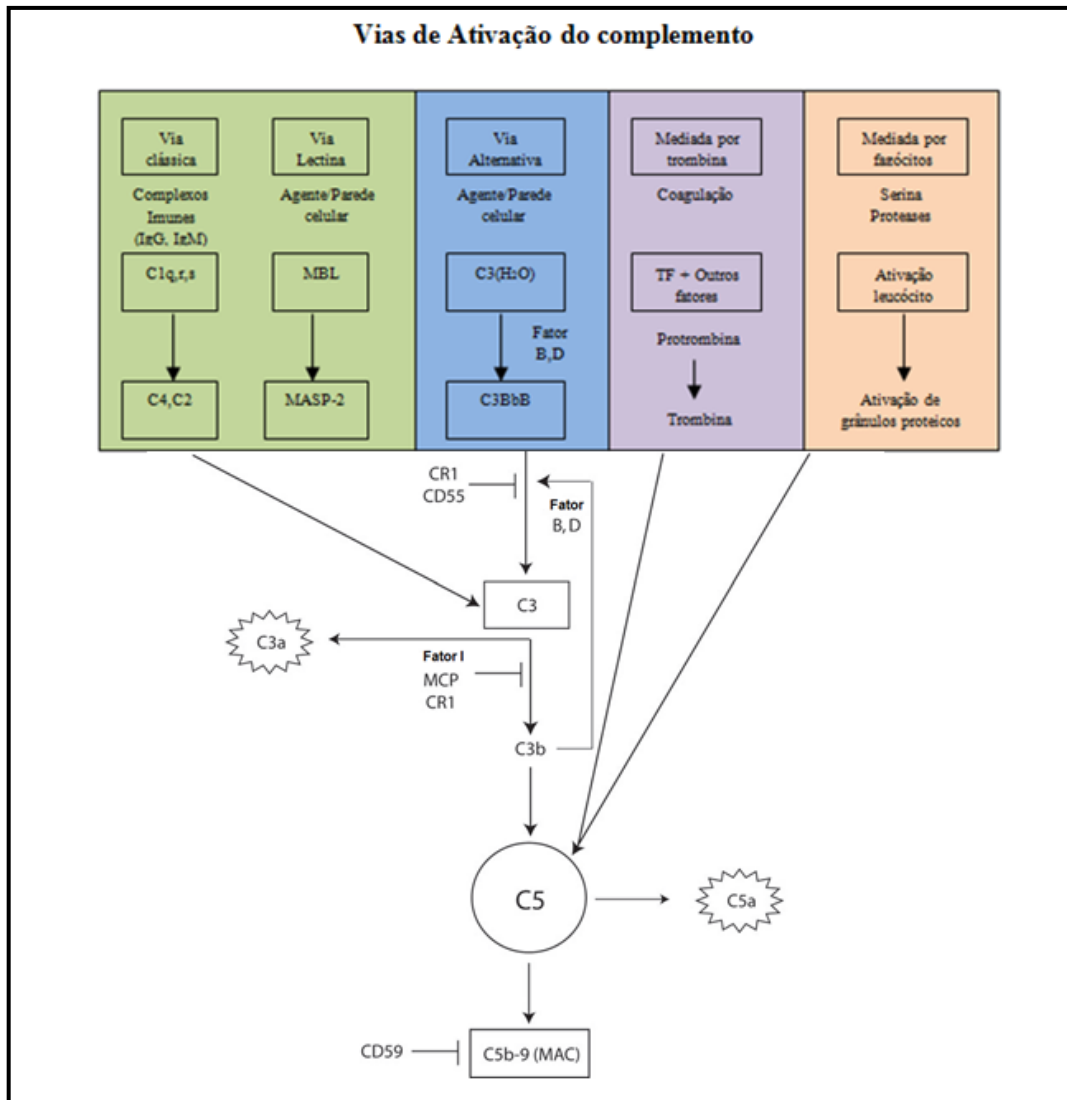
A via clássica é iniciada por C1q ligando-se à porção do anticorpo de complexos imunes. Complexos imunes em circulação são elevados na malária severa e a deposição de IgG na superfície de eritrócitos infetados e não infetados está aumentada em pacientes com AMS (Waitumbi, et al., 2000). A supra-regulação de C1q foi observada em placentas de mulheres primigrávidas infetadas com *P. falciparum*. Da importância de indivíduos com imunidade adquirida específica para malária, a proteína C reativa (PCR), é elevada no soro instalada a infecção por *P. falciparum* (Harpaz, et al., 1992), e é capaz de ativar a via clássica por ligação com C1q (Jiang, et al., 1992).

Elevados níveis de plaquetas humanas, que estão também associadas á malária e ao aumento do risco de mortalidade podem também ativar C4 num recetor C1q, sugerindo que a ativação do complemento mediada por plaquetas pode contribuir para a iniciação de malária severa (Silver, et al., 2010).

Enquanto os parasitas *Plasmodium spp.* se desenvolvem em trofozoítos maduros, a superfície do eritrócito infetado é propícia para a ativação espontânea de C3, e consequentemente a ativação da cascata do sistema complemento. A hematina, produto da lise do eritrócito induzida por *P. falciparum*, é também capaz de ativar as proteínas do complemento por via alternativa (Kaca & Roth, 1995). A ativação adicional da via alternativa pode ocorrer por via das plaquetas (Fator D) derivado dos danos vasculares (Peerschke, et al., 2008). Como suporte do papel da via alternativa na clinica por malária, níveis aumentados de C3bBb específicos da VA têm sido observados em infeções experimentais por *P. falciparum* (Roestenberg, et al., 2007).

Passou quase um século desde que o sistema do complemento foi descoberto. A ativação do complemento exerce as suas ações danosas por meio de proteínas de complemento especialmente C3a e C5a. Embora estes produtos de ativação não sejam necessariamente os fatores que iniciam as doenças inflamatórias, eles parecem ser responsáveis pela promoção e perpetuação das reações inflamatórias (Silver, et al., 2010). Entre os produtos de ativação do complemento, o C5a é um dos mais potentes péptidos inflamatórios, com um largo espectro de funções (Guo & Ward, 2005).





**Figura 7:** Vias de ativação do complemento. Adaptado de (Silver, *et al.*, 2010).

Outros mecanismos de defesa imune inata como fatores humorais podem também ter um papel na contenção de infecção por *Plasmodium spp.*. Anticorpos naturais da classe IgM podem ser protetores contra a infecção num mecanismo dependente da ativação do complemento pela via clássica. O sistema do complemento pode ter também um papel protetor, dependente ou independente de anticorpos em hospedeiros infectados por *Plasmodium spp.*. Contudo, o papel deste sistema em infecções por protozoários é controverso, podendo mesmo contribuir para a disseminação parasitária (Arosa, *et al.*, 2007).

As “toxinas” produzidas durante o curso da infecção da malária incluem moléculas derivadas do parasita que são secretadas ou libertadas dos parasitas em estádios terminais (trofozoítos e especialmente esquizontes) e que induzem o hospedeiro humano a produzir citocinas. A produção de citocinas IL-1 (do inglês *Interleukin*) e TNF- $\alpha$  como consequência do reconhecimento de antígenos parasitários por parte dos macrófagos, neutrófilos ou células dendríticas parece constituir um mecanismo fundamental de defesa imune inata. Estas citocinas induzem a produção de IFN- $\gamma$  por células NK e, através desta citocina, a ativação de mecanismos efetores microbicidas em macrófagos. Isto mostra que não só antígenos estruturais participam na ativação destes mecanismos de resposta imune inata (Chen, *et al.*, 2000; Langhorne, *et al.*, 2008).

As citocinas são responsáveis por muitos dos sintomas e sinais da malária, particularmente a febre e distúrbios do sistema imunitário. Quantidades moderadas de citocinas como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 são necessários para que o hospedeiro combata o parasita, enquanto o seu excesso poderá ser deletério para o próprio hospedeiro (Chen, *et al.*, 2000). A produção precoce de IFN- $\gamma$  parece ser um requisito para a aquisição da resistência contra a infecção (Angulo & Fresno, 2002). Também podem ser mediadores da morte do parasita pela ativação de leucócitos e possivelmente outras células, pela libertação de espécies tóxicas de oxigénio, óxido nítrico e pela geração de peróxidos lipídicos parasiticidas. Os anticorpos e a resposta pró-inflamatória protegem contra as formas assexuadas sanguíneas. A proteção mediada pela resposta pró-inflamatória poderá estar relacionada com as citocinas como o TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  e com a libertação de mediadores como o óxido nítrico (ON) (Miller, *et al.*, 2002).

Dos fatores humorais que intervêm na imunidade, um dos mais importantes é o sistema complemento. Os componentes terminais (C5 a C9) da cascata de ativação do complemento vão dar origem a um complexo de ataque à membrana celular, MAC (do inglês *Membrane Attack Complex*) que lesa a célula alvo produzindo poros ou canais na sua parede celular, levando à perda, por extravasamento, de constituintes citoplasmáticos, o que resulta na morte da célula alvo. Além do sistema complemento, existem outros fatores humorais relevantes que intervêm na imunidade inata: (i) fatores

quimiotáticos, sendo um dos mais importantes o fator C5a do complemento; (ii) properdina, que tem um importante papel na estabilização do complexo C3bBb (C3 convertase), enzima capaz de desdobrar o componente C3 da via alternativa do complemento; (iii) interferão (IFN), proteína produzida pela célula infectada e que protege outras células de serem infectadas pelo mesmo agente; (iv) lisozima, presente no soro, saliva, lágrimas, secreções nasais e outros fluídos orgânicos. Têm um papel complementar na ação lítica do complemento; (v) lactoferrina e transferrina, lactoperoxidase, e lisina-beta, importantes na ação anti-microbiana.

Os anticorpos e a resposta pro-inflamatória protegem contra a forma assexuada na fase sanguínea de alguns tipos de malária em animais e provavelmente contra a malária humana. A proteção mediada pela resposta pro-inflamatória pode referir-se às citocinas TNF- $\alpha$  (do inglês *Tumor-Necrosis Factor- $\alpha$* ) e IFN- $\gamma$  (do inglês *Interferon- $\gamma$* ), e à libertação de mediadores tais como o óxido nítrico (ON) (Miller, *et al.*, 2002).

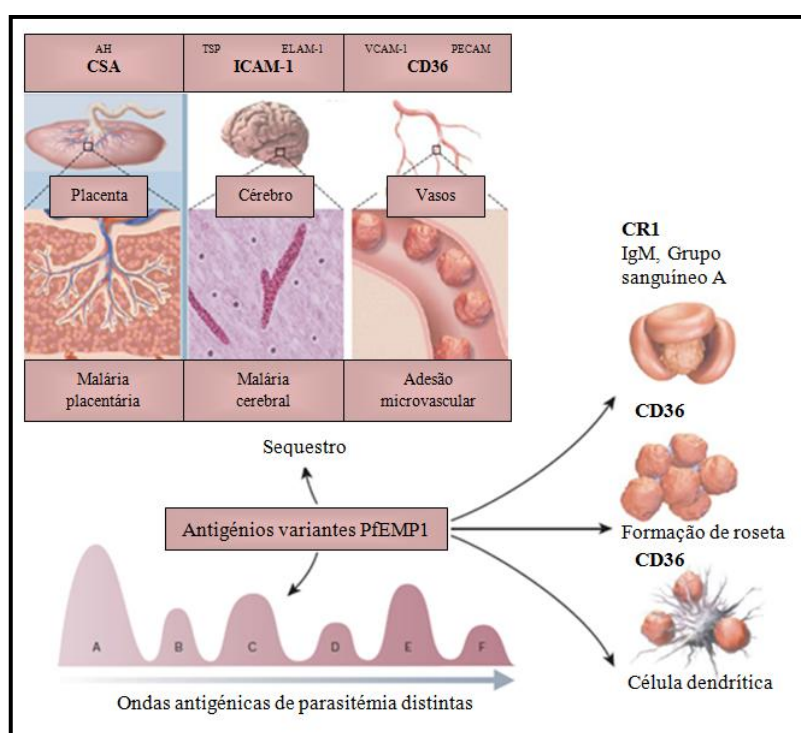
A TNF induzida pelas “toxinas” da malária foi identificada como sendo um importante mediador da doença e consequentemente a produção desta e de outras citocinas pirogênicas relacionadas (IL-1, IL-6) são normalmente tomadas como marcadores substitutos na iniciação do processo patológico na infeção por malária (Clark & Schofield, 2000).

Foram comprovadas evidências de que uma molécula em particular está envolvida na indução de resposta pro-inflamatória a partir de um ensaio que mediu a libertação de TNF- $\alpha$  por macrófagos *in vitro*. O isolamento de componentes subcelulares do parasita acoplado a este ensaio *in vitro* levou à identificação de um componente denominado de GPI (do inglês *glycosylphosphatidylinositol*). Os resíduos de GPI funcionam como âncoras para as proteínas parasitárias MSP1 e MSP2 como indutoras de citocinas pro-inflamatórias. Anticorpos produzidos contra os componentes GPI estão associados à ausência da doença no adulto (Miller, *et al.*, 2002).

Foi demonstrado que a molécula de GPI de *P. falciparum* exerce efeitos regulatórios nas células do hospedeiro e atua como toxina do parasita pela sua habilidade de

produzir, através dos macrófagos, TNF e IL-1. A GPI de *P. falciparum*, quando administrada experimentalmente a ratos induz uma febre passageira, e pode causar a morte a receptores através da caquexia mediada por TNF. Esta descoberta providencia a primeira evidência para a atividade pro-inflamatória derivada da GPI do parasita (Clark & Schofield, 2000).

As GPIs de *Plasmodium spp.* induzem uma extensão de outras atividades nos vários tecidos e tipos de células, o que pode ser importante em muitos síndromes fisiopatológicos na doença e pode influenciar seriamente a competência imune. As mesmas podem diretamente, ou em sinergia com o IFN- $\gamma$ , aumentar a expressão do gene iNOS (óxido nítrico sintase) e a produção de óxido nítrico, implicados na etiologia do síndrome de malária cerebral, e aumentando ainda a regulação na expressão da ICAM-1 e VCAM-1 nas células hospedeiras (Clark & Schofield, 2000).



**Figura 8:** A variante na família antigénica de PfEMP1 é central na interação parasita-hospedeiro e na patogénese (AH, ácido hialurónico; TSP, trombospondina; ELAM-1, molécula de adesão endotelial/leucócito 1; VCAM-1, molécula de adesão a célula vascular 1; PECAM (CD31), molécula de adesão a célula do endotélio/plaqueta; CR1, recetor do complemento 1). Adaptado de (Miller, *et al.*, 2002).

Do ponto de vista teórico, a resposta imune pode ser direcionada para qualquer ponto do ciclo de vida do parasita, desde a altura da entrada dos esporozoítos (Langhorne, *et al.*, 2008). No entanto, estudos longitudinais sugerem que a resposta imune à fase pré-eritrocitária tem, provavelmente, um envolvimento limitado (Owusu-Agyei, *et al.*, 2001). Após uma infecção natural, há uma resposta humoral transitória aos antígenos dos esporozoítos. A aquisição de imunidade natural à malária é lenta e requer exposição repetida para a sua manutenção. Esta imunidade reduz o risco tanto de malária grave como da não grave, mas não elimina a parasitemia (Leoratti, *et al.*, 2008). Os anticorpos anti-esporozoítos têm uma semi-vida de três a quatro semanas. Existe evidência que mecanismos dependentes de anticorpos têm um papel importante na redução da parasitemia e podem diminuir os sintomas clínicos em humanos (Plebanski & Hill, 2000).

Relativamente ao papel das células linfocíticas, a ativação e diferenciação dos linfócitos B culmina na formação de plasmócitos, que funcionam como “fábricas especializadas” em sintetizar e exportar um único produto: uma imunoglobulina (ou anticorpo). Assim, os plasmócitos e os anticorpos são mediadores finais das respostas humorais da imunidade adaptativa. Os diferentes isotipos das imunoglobulinas têm funções distintas (Tabela 3). Os principais mecanismos efetores mediados por linfócitos B são:

- Neutralização do agente agressor;
- Opsonização/Fagocitose;
- Ativação do complemento;
- Citotoxicidade dependente de anticorpos (ADCC);
- Desgranulação de mastócitos e basófilos e/ou eosinófilos.

Os isotipos envolvidos na neutralização de agentes agressores são: IgG, IgM e IgA. A importância destas imunoglobulinas na neutralização de microrganismos está intimamente relacionada com a sua localização. Assim, a IgG é a principal imunoglobulina do sangue e dos fluidos extracelulares, enquanto a IgA é o principal isotipo nas secreções (Arosa, *et al.*, 2007).

As principais subclasses de imunoglobulinas envolvidas na opsonização seguida de fagocitose são a IgG1 e IgG3, seguidos de IgG4, enquanto que a IgG2 tem uma afinidade extremamente baixa. A IgA poderá também ter um papel importante na fagocitose (Afridi, *et al.*, 2012).

**Tabela 3:** Funções dos diferentes isotipos de imunoglobulinas. Adaptado de (Arosa, *et al.*, 2007)

Mecanismo	Classe da Imunoglobulina <sup>1</sup>							
	IgM	IgD <sup>2</sup>	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgA	IgE
Neutralização	+	-	++	++	++	++	++	-
Opsonização/Fagocitose	-	-	+++	- <sup>3</sup>	++	+	+	-
Ativação do complemento	+++	-	++	+	+++	-	+	-
ADCC (citotoxicidade dependente de anticorpos)	-	-	++	-	++	-	+	+
Desgranulação de mastócitos e basófilos e/ou eosinófilos	-	-	+ <sup>4</sup>	-	+ <sup>4</sup>	-	+ <sup>4</sup>	+++

<sup>1</sup> Para cada imunoglobulina: +++, ++, +, para a função principal, menos importante, e ainda menos importante, respetivamente; - não participa

<sup>2</sup> A IgD participa no desenvolvimento dos linfócitos B

<sup>3</sup> Em cerca de 50% dos caucasianos, que apresentam um determinado alótipo de FcYR, a IgG2 pode atuar como opsonina

<sup>4</sup> A notar que, apesar de a desgranulação dos eosinófilos desencadeada pelas IgG1, IgG3 e IgA ter sido incluída neste tipo de mecanismo, por vezes é considerada ADCC contra os parasitas (ver linha imediatamente superior)

Os anticorpos podem iniciar a destruição de agentes patogénicos por ativarem o sistema complemento. A IgM pentamérica é um potente ativador do complemento por via clássica. O C1q liga-se ao domínio CH3 da IgM quando está ligada ao antígeno. As subclasses IgG3, IgG1 e IgG2 também ativam a via clássica do complemento, sendo a hierarquia dos subtipos para C1q: IgG3>IgG1>IgG2. A IgA pode ativar o complemento pela via alternativa ou pela via lectina (Arosa, *et al.*, 2007).

A citotoxicidade dependente de anticorpos ou ADCC é um mecanismo pelo qual certas células do sistema imunológico destroem células alvo enquanto estas se encontram revestidas por anticorpos. As principais células efetoras são os linfócitos NK (Bouharoun-Tayoun, *et al.*, 1992). Anticorpos IgG ligam-se aos recetores FcγRIIIa (CD16) existente à superfície destas células permitindo que se liguem especificamente às células alvo portadoras do antígeno. Uma vez que o FcγRIIIa se liga às imunoglobulinas IgG1 e IgG3 (reconhece o domínio CH2 da porção Fc destas IgG),

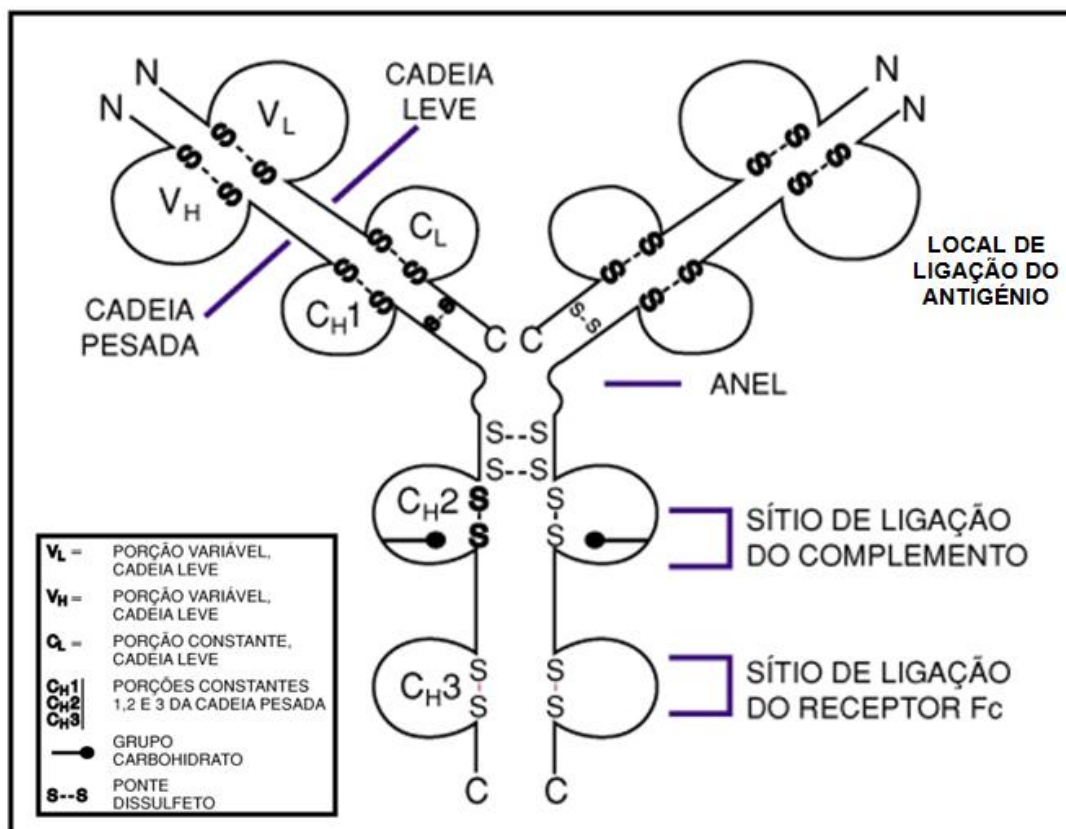
estes são os isotipos mediadores da ADCC. A agregação de vários FcR ativa os linfócitos NK provocando uma polarização dos grânulos líticos para a área de contacto entre o linfócito e a célula alvo. A libertação dos grânulos líticos sobre a célula alvo induz a sua morte celular por apoptose ou por lise (Garraud, *et al.*, 2003).

A imunoglobulina do tipo IgE é a responsável pela desgranulação de mastócitos e basófilos em situações de reação alérgica. Estas células expressam à sua superfície um recetor de alta afinidade para a IgE (O FcεRI, que reconhece o domínio CH3 da porção Fc da IgE). Assim, apesar das baixas concentrações séricas de IgE, as superfícies destas células são altamente revestidas por IgE, que serve como recetor para o antígeno. A ligação das IgE aos seus recetores não induz a ativação destas células. Apenas na presença do antígeno, capaz de fazer a agregação das IgE dos complexos FcεRI/IgE, é que estas células são ativadas sendo desencadeada a libertação dos mediadores inflamatórios (Arosa, *et al.*, 2007). Os níveis de IgE e anticorpos IgE anti-Plasmodium estão aumentados na malária, mas o seu papel na proteção e/ou na patogénese não está completamente estabelecida, embora haja estudos que associem o seu aumento à malária cerebral (Perlmann, *et al.*, 1994) e outros que consideram que IgE específicos para *P. falciparum* parecem contribuir para o controlo dos parasitas, tendo maior atividade em formas não complicadas de malária (Duarte, *et al.*, 2007).

Os anticorpos têm a mesma estrutura geral (Figura 9): são compostas por quatro cadeias polipeptídicas, duas cópias de cadeias pesadas (H de *heavy*) e duas de cadeias leves (L de *low*). Existem duas formas de cadeias L (κ e λ) e cinco cadeias H (α, δ, ε, γ e μ) as quais diferem na sequência de aminoácidos; as cadeias H são glicosiladas. As cadeias L e H estão “ancoradas” ambas por interações não-covalentes e pontes de dissulfureto. Nas regiões N-terminal das cadeias H e L existem variáveis, formadas por resíduos de ambas as cadeias, que compreende o local de ligação do antígeno (Pingoud, *et al.*, 2005).

Dado que os anticorpos são feitos de duas cadeias H e duas cadeias L, têm estruturas bivalentes e possuem dois locais de ligação antígenica idênticos. O fim do C-terminal da proteína contém os domínios constantes, os quais são responsáveis por diferentes

funções fisiológicas na resposta imune, tais como a ligação do complemento. O tipo de cadeia H determina a classe, ou isotipo, de anticorpo: IgA (cadeias- $\alpha$ ), IgD (cadeias- $\delta$ ), IgE (cadeias- $\epsilon$ ), IgG (cadeias- $\gamma$ ) e IgM (cadeias- $\mu$ ). As classes IgG e IgA são ainda subdivididas em subclasses, IgG1, IgG2 etc. Os vários isotipos têm diferentes estruturas mediante diferentes funções imunológicas; elas são apresentadas em diferentes concentrações e têm diferentes períodos de semi-vida (Tabela 4) (Pingoud, *et al.*, 2005).



**Figura 9:** Estrutura geral de uma imunoglobulina. A imagem ilustra as características essenciais de uma imunoglobulina IgG. Adaptado de (Pingoud, *et al.*, 2005).

A cadeia  $\mu$  (IgM) é a primeira cadeia pesada a ser expressa durante o desenvolvimento do linfócito B, inicialmente com uma cadeia leve suplente, e que permite a maturação do linfócito B na medula óssea. Posteriormente, a cadeia  $\mu$  associa-se com uma cadeia leve funcional e os linfócitos B *naive* imaturos saem da medula óssea. Na periferia a imunoglobulina IgM pode ser expressa por linfócitos B imaturos, maduros, de memória e plasmócitos, sendo mais comum nos primeiros. Nestes, é a presença das IgM associadas às moléculas  $Ig\alpha$  e  $Ig\beta$  que fornece os sinais de ativação ao linfócito B que,



após ativação, entra num processo de maturação de afinidade. A forma IgM membranar é a mais comum. No entanto, os plasmócitos segregam IgM, principalmente numa forma pentamérica, que constitui um ativador importante do complemento, e portanto, na participação da fagocitose. Enquanto a forma monomérica tem uma baixa afinidade para o antígeno, na forma pentamérica a IgM possui uma avidéz considerável para o antígeno, permitindo às IgM ligarem-se a epitopos poliméricos de baixa afinidade (Arosa, *et al.*, 2007). Os resultados são contraditórios em relação aos anticorpos IgM, existindo dados epidemiológicos que sugerem que anticorpos IgM não participam na proteção contra a malária (Branch, *et al.*, 1998) e outros estudos que dão importância ao papel de anticorpos IgM, nomeadamente na resposta à vacina da malária, o que poderá contribuir para aumentar o potencial efeito protetor da mesma (Boudin, *et al.*, 1993) (Czajkowsky, *et al.*, 2010) e à possível correlação dos seus níveis com a diminuição da parasitemia em indivíduos de áreas hiperendémicas de malária (Boudin, *et al.*, 1993).

A imunoglobulina do tipo IgG é o subtipo mais abundante no soro (cerca de 75% das imunoglobulinas totais), assim como na linfa e nos fluídos peritoneais. Tem uma grande estabilidade no soro com um período de semivida de cerca de três semanas. Funcionalmente as IgG de elevada afinidade para o antígeno são responsáveis pela resposta imunológica humoral e nos humanos existem 4 subclasses de IgG. As principais diferenças estruturais entre as quatro subclasses são o tamanho da região da charneira e o número e posição das ligações dissulfureto entre as cadeias pesadas. As pequenas diferenças a nível da sequência de aminoácidos existentes entre as subclasses de IgG afetam as propriedades funcionais da molécula. As IgG1, IgG2 e IgG3 atravessam a placenta e desempenham um papel importante na proteção do feto em desenvolvimento. A IgG3 é a mais eficiente na ativação do complemento, seguido da IgG1. A IgG2 é menos eficiente e a IgG4 não é capaz de ativar o complemento. As IgG1 e IgG3 ligam-se com elevada afinidade aos recetores Fc das células fagocíticas (por isso designadas citofílicas) sendo, portanto, mediadoras de opsonização. A IgG4 tem uma afinidade intermédia, e a IgG2 tem uma afinidade extremamente baixa (Arosa, *et al.*, 2007).

**Tabela 4:** Diferentes propriedades das classes e subclasses de imunoglobulina humana. Adaptado de (Arosa, *et al.*, 2007).

Propriedades	Classe ou subclasse								
	IgM	IgD	IgG				IgA		IgE
			IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgA1	IgA2	
Cadeia Pesada	M	$\delta$	$\gamma 1$	$\gamma 2$	$\gamma 3$	$\gamma 4$	$\alpha 1$	$\alpha 2$	E
Peso Molecular da forma segregada (kDa) <sup>1</sup>	950(p)	175	150	150	130	150	160(m) 300(d)	160(m) 300(d)	190
Cadeia J	+	-	-	-	-	-	+	+	-
Concentração sérica nos humanos adultos (mg/mL) <sup>2</sup>	0,25-3,1	0,03	5-12	2-6	0,5-1	0,2-1	1,4-4,2	0,2-0,5	0,0001-0,0002
Percentagem das Ig séricas totais nos humanos adultos (%)	10	0,2	45-53	11-15	3-6	1-4	11-14	1-4	0,004
Taxa de síntese diária (mg/Kg peso/dia)	3,3	0,2	33	33	33	33	19-29	3,3-5,3	0,002
Tempo de semivida, T <sub>1/2</sub> (dias)	5-10	2-8	21-24	21-24	7-8	21-24	5-7	4-6	1-5
Transferência transplacentária	-	-	+++	+	++	-	-	-	-
Ativação das vias clássicas do complemento	++++	-	+++	+	++++	-	-	-	-
Ativação das vias alternativas e da lectina do complemento	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Ligação aos macrófagos e outras células fagocíticas através do Fc $\gamma$ R	-	-	+++	+/-	+++	+	-	-	-
Transporte através de mucosas <sup>3</sup>	+	-		-			++		-
Ligação ao Fc $\epsilon$ R dos mastócitos e basófilos	-	-		-			-		+++

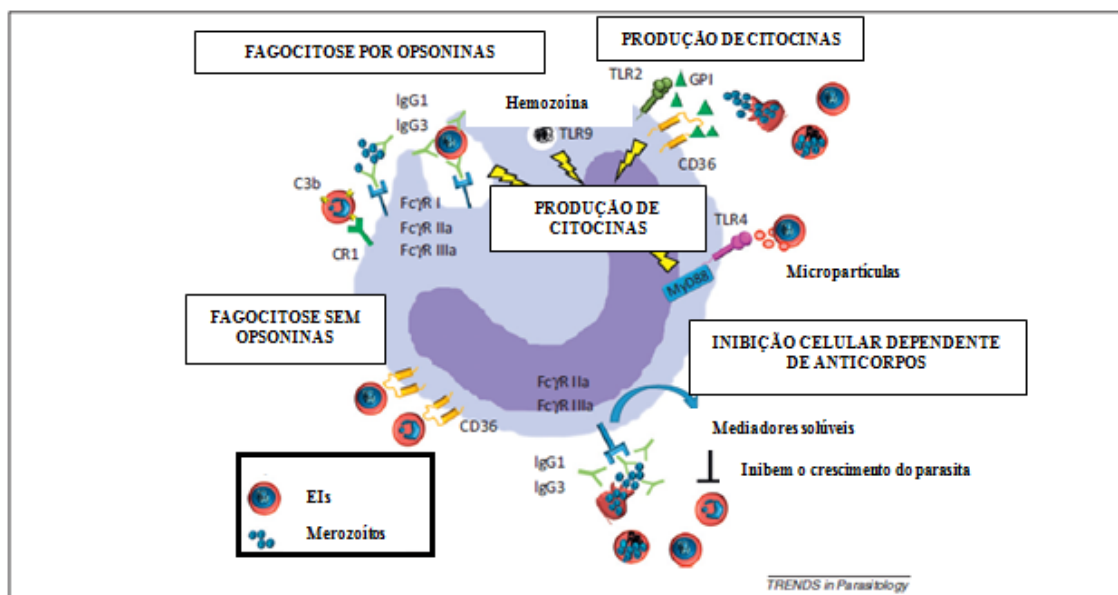
A imunoglobulina do tipo IgA é a principal das secreções tais como o leite materno, saliva, lágrimas, muco dos brônquios, aparelho genito-urinário e digestivo. Nos humanos existem duas subclasses de IgA (IgA1 e IgA2). A IgA2, que possui uma forma truncada da região de charneira, resistente à maior parte das proteases bacterianas, é a componente principal da forma segregada nas mucosas, e constitui um importante componente de defesa de primeira linha contra agentes patogénicos que entram no organismo pelas mucosas. No soro, a IgA representa cerca de 10% a 15% da concentração total de imunoglobulinas (sendo a forma mais frequente a IgA1) e fornece proteção imunológica principalmente pela neutralização de agentes patogénicos ou por fixação do complemento (pela via alternativa ou da lectina). Os agentes patogénicos opsonizados pela IgA são removidos por fagocitose mediada pelo recetor FcαR (Arosa, *et al.*, 2007). Quanto aos anticorpos IgA, ainda não se encontrou nenhuma função específica na malária (Leoratti, *et al.*, 2008).

Células imunes inatas da linhagem de monócitos, incluindo monócitos, células dendríticas e macrófagos, desempenham um papel indispensável durante a infeção por malária. Os monócitos derivam das “*stem cells*” hematopoiéticas na medula óssea e são libertadas no sangue em circulação periférica em maturação. Em hospedeiros infetados por malária, os macrófagos nos vários órgãos estão diretamente envolvidos na interação *Plasmodium falciparum* – Eritrócitos infetados (EI), incluindo macrófagos no fígado (células Kupffer), baço e medula óssea. As células dendríticas, monócitos e macrófagos (DMM), usam várias superfícies celulares e recetores citolíticos para receber e responder aos EI e outros produtos parasitários (Chua, *et al.*, 2012).

Vários componentes do parasita podem ativar células dendríticas, monócitos e macrófagos, direta ou indiretamente por uma primeira ativação ou fatores imunes do hospedeiro.

Após a invasão dos eritrócitos pelos merozoítos são induzidas grandes transformações na superfície do eritrócito infetado, incluindo a inserção de proteínas do parasita que podem interagir com os recetores nas superfícies das DMM. Os EIs, ou micropartículas da sua membrana plasmática, são potentes imunogénos que podem promover

diretamente a ativação de macrófagos. Em alternativa, os EIs podem levar à ativação do complemento, resultando na deposição do fragmento C3b na superfície do EI e à interação com recetores DMM do complemento. A aquisição de anticorpos específicos para antígenos específicos permite o reconhecimento de EIs via recetores DMM Fcγ (FcγRs). A rutura do estado maduro nos EIs liberta merozoítos que também são sinalizados por anticorpos e DMM ativos via interações FcγR. Além disso, as DMM expressão recetores “*Toll-like*” (TLRs) à superfície e a nível intracelular, que estão envolvidos no reconhecimento dos PAMPs (do *inglês* *Pathogen-Associated Molecular Patterns*). Produtos associados ao parasita, incluindo o componente GPI e vacúolos digestivos do parasita contendo hemozoína, são PAMPs que podem ativar diretamente os TLRs expressos pelas DMM (Chua, *et al.*, 2012).



**Figura 10:** Mecanismos envolvidos na proteção contra a malária por células dendríticas, monócitos e macrófagos. Adaptados de (Chua, *et al.*, 2012).

O papel das citocinas anti-inflamatórias é controverso na malária grave, isto porque existem estudos reportando altas concentrações de IL-10 como estando associadas a malária grave (Peyron, *et al.*, 1994; Iriemenam, *et al.*, 2009) e outros que a consideram fator protetor de malária grave (Kutis, *et al.*, 1999). Níveis baixos de IL-10 estão associados a anemia grave da malária (Kurtzhals, *et al.*, 1998). Também foi demonstrado que o equilíbrio entre as concentrações de IL-10 e TNF-α determina a

gravidade da anemia em crianças afetadas (Othoro, *et al.*, 1999). Dentro da mesma linha de evidência, níveis plasmáticos de TGF- $\beta$ , que atua em altas concentrações como uma citocina anti-inflamatória, são inversamente correlacionadas com a gravidade da malária em modelos murinos, bem como em humanos (Prakash, *et al.*, 2006).

Alguns autores propõem que citocinas como as IL-1 $\beta$ , IL-12 e IFN- $\gamma$  discriminam malária cerebral de malária grave não cerebral, estando os níveis de IL-1 $\beta$  mais associados à malária cerebral e níveis aumentados de IL-12 e IFN- $\gamma$  associados à malária grave não cerebral (Prakash, *et al.*, 2006). Neste estudo, a severidade da doença era independente da carga parasitária, sexo ou idade (Prakash, *et al.*, 2006).

Por outro lado, tem-se discutido o papel dos TLRs como iniciadores do processo pró-inflamatório, havendo autores que sugerem que TLR9 e MyD88 são essenciais para iniciar as respostas da IL-12 e IFN- $\gamma$  e favorecem a hiper-resposta do hospedeiro aos agonistas dos TLR, resultando na hiperprodução de citocinas e nos sintomas *sepsis-like* da malária aguda (Franklin, *et al.*, 2009).

Em resumo, a contribuição das citocinas na malária grave incluem a supra-regulação da expressão de recetores do endotélio e a sua redistribuição na superfície endotelial, distúrbios físicos do hospedeiro, como a febre alta, a supra-regulação da produção de óxido nítrico, que poderá causar dano local no sítio da sequestração e a supressão da produção de eritrócitos na medula óssea (Chen, *et al.*, 2000).

## **1.5 Medidas de controlo da malária**

Existem métodos eficazes para o controlo da malária: impedir a picada por mosquitos, usando mosquiteiros e aplicações de pulverização de inseticida tratados com inseticida, realizar o tratamento de pacientes infetados com medicamentos eficazes, tais como terapias combinadas à base de artemisinina (ACTs), promover a educação em saúde e continuar a promover a comunicação e monitorização de casos (Teklehaimanot, *et al.*, 2007). Informações sobre a população em risco de malária e incidência da doença são

fundamentais para a concepção e implementação de programas de controlo da malária (Cibulskis, *et al.*, 2007).

O financiamento conseguido para o controlo do paludismo possibilitou aos países com paludismo endémico incrementarem fortemente as atividades de prevenção. Durante a última década, as intervenções para o controlo do vetor aumentaram substancialmente. A percentagem de habitações com pelo menos uma rede mosquiteira impregnada com inseticida (ITN) na África Subsariana calcula-se ter aumentado de 3% em 2000 para 53% em 2011, mantendo-se a mesma percentagem em 2012. Os inquéritos aos agregados familiares indicam que cerca de 90% das pessoas com acesso a um mosquiteiro impregnado na sua residência, utilizam-no. A percentagem que se encontra protegida pela pulverização intra domiciliária (IRS) na Região Africana cresceu de menos de 5% em 2005 para 11% em 2010 e permaneceu nesse nível em 2011. A monitorização da resistência aos inseticidas e um componente necessário na implementação das intervenções de controlo do vetor com inseticida (OMS, 2012).

Relativamente à quimioprofilaxia o Tratamento Preventivo Intermitente (TPI), é recomendado em grupos populacionais de áreas com uma elevada transmissão e que sejam particularmente vulneráveis a infestação pelo *Plasmodium* e as suas consequências, em particular as mulheres grávidas e as crianças. Desde Outubro de 2012 a OMS recomenda TPI em cada uma das consultas do calendário pré-natal depois do primeiro trimestre. Todas as crianças em risco de infeção pelo *Plasmodium falciparum* nos países da África Subsariana com risco de transmissão médio ou elevado e com baixos níveis de resistência do parasita à terapêutica recomendada de Sulfadoxina-Pirimetamina devem receber tratamento preventivo para o paludismo através dos serviços de vacinação em intervalos definidos e acordados com os intervalos correspondendo ao calendário de vacinação definido (OMS, 2012).

## **1.6 Diagnóstico Laboratorial**

O diagnóstico rápido e correto da malária é uma componente crucial das estratégias de controlo da malária e da vigilância epidemiológica da doença.

Uma identificação errônea da infecção por malária pode ter consequências perigosas. Um reconhecimento preciso é particularmente importante (1) na gestão de um paciente, quando o diagnóstico incorreto pode resultar na falha ou de tratar uma doença potencialmente perigosa, ou na incapacidade de procurar e tratar uma outra causa da doença, (2) na inscrição "casos" num estudo da patogénese ou terapia, quando falsos diagnósticos podem mascarar resultados importantes, (3) ao identificar “*endpoints*” em intervenção preventiva ou ensaios terapêuticos, (4) ao documentar a extensão do problema de saúde pública e como isso muda com o tempo, quando as tendências corretamente identificadas podem indicar a necessidade de novos esforços ou o sucesso das já existentes (Koram & Molyneux, 2007).

Os anticorpos são proteínas capazes de reconhecer outros componentes, denominados antígenos, estranhos ao organismo. A interação anticorpo-antígeno é altamente específica, sendo esta especificidade explorada em inúmeros procedimentos analíticos. Para uso de tais procedimentos, é necessário que os anticorpos relevantes estejam disponíveis (Pingoud, *et al.*, 2005).

Colocando estes métodos num contexto, quando um animal vertebrado é exposto a moléculas estranhas, são despoletadas respostas imunes com intuito de destruir e eliminar organismos invasores e toxinas, produzidas pelos mesmos. Existem duas amplas classes de resposta imune: a resposta humoral, a qual depende da produção e circulação de anticorpos e a resposta celular, que envolve a produção de células especializadas que reagem com antígenos estranhos na superfície das células hospedeiras. Embora sejam muitas as células participantes nesta resposta, o local de produção de anticorpos é nos linfócitos B os quais, na sua forma madura, são denominados plasmócitos (Pingoud, *et al.*, 2005).

Cada plasmócito produz anticorpos com uma determinada especificidade, havendo inúmeras cópias idênticas, ou clones, todos produzindo o mesmo anticorpo monoclonal. Outras linhas de plasmócitos produzem anticorpos que reconhecem o mesmo antígeno tendo no entanto diferentes estruturas. O elemento estrutural no antígeno que é reconhecido por um anticorpo tem a denominação de determinante antigénico ou

epítopo. A preparação de um anti-soro, quer diretamente isolado da colheita sanguínea ou frações enriquecidas de imunoglobulina, é portanto policlonal.

A microscopia tem sido o método de eleição para a determinação da prevalência da malária em levantamentos epidemiológicos, permitindo a quantificação e diferenciação de espécies *Plasmodium* a baixo custo. A escolha entre a microscopia e testes de diagnóstico rápido (TDRs) nem sempre é clara pois o desempenho de ambas as técnicas de diagnóstico varia de acordo com a intensidade de transmissão, a prevalência das infeções, e densidade parasitária (Fançon, *et al.*, 2013).

A microscopia é relatada por perder, em áreas de baixa transmissão até 88 % das infeções. Em instalações de saúde em África, onde o diagnóstico por microscopia é usado, os resultados são frequentemente pouco fiáveis (Lubell, *et al.*, 2007). Têm sido reconhecidos na prática microscópica vários fatores problemáticos, incluindo a formação e competências de manutenção, técnicas de preparação de lâminas, carga de trabalho e condição do microscópio (Wongsrichanalai, *et al.*, 2007).

Em pequenas unidades de saúde em África, o único método de diagnóstico parasitológico atualmente realista é através do uso de TDRs (Lubell, *et al.*, 2007). A disponibilidade de TDRs tem aumentado tendo a percentagem de casos suspeitos que foram objeto de um teste parasitológico crescido globalmente de 68% em 2005 para 77% em 2011, com o maior incremento a verificar-se na Africa Subsariana. No entanto, o aumento nos testes de diagnóstico entre 2010 e 2011 foi apenas de 1% (OMS, 2012).

O TDR é um dispositivo que deteta antígenos de malária numa pequena quantidade de sangue, geralmente 5-15µL, por imunoensaio com anticorpos monoclonais dirigidos contra antígeno do parasita e impregnado numa tira de teste. O resultado, geralmente uma linha de teste de cor, é obtido em 5-20 min. Os TDRs não requerem investimento de capital ou eletricidade, são simples de executar, e são fáceis de interpretar (Wongsrichanalai, *et al.*, 2007). Por outro lado, o desempenho de TDRs HRP2 é afetado pela deteção da resposta imunitária persistente de infeções anteriores, o que leva a falsos positivos e superestimar a prevalência. Deleções ou mutações dentro do gene



pflhrp-2 e o efeito pró-zona pode levar de falsos negativos. Outro fato é o da sensibilidade dos TDRs poder variar devido à sua vulnerabilidade a temperaturas extremas e alta humidade que ocorre em trabalho de campo. Considerando estas limitações, o uso de TDRs na malária em campo só é aconselhável quando utilizado em comparação com microscopia, como recomendado pela OMS (Fançonny, *et al.*, 2013).

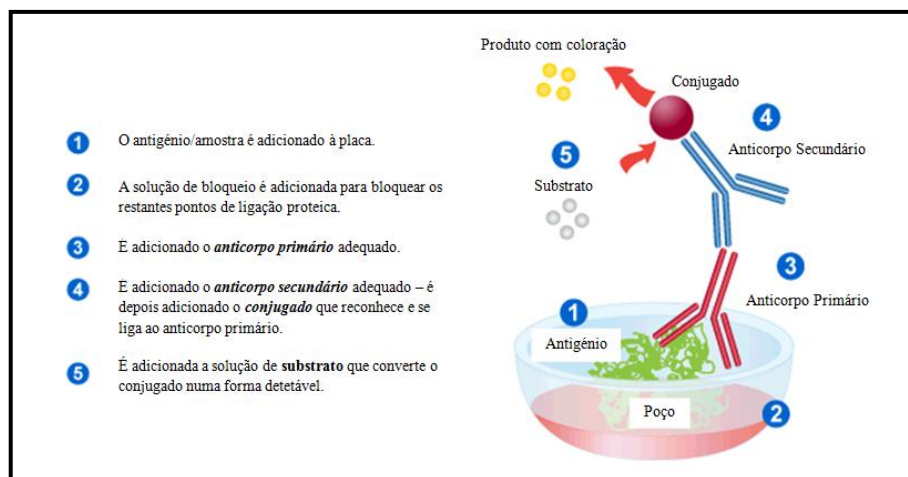
Alternativamente, o PCR é altamente sensível, detetando casos de baixa parasitémia não identificados por outras técnicas e facilmente reprodutível. É contudo altamente dispendioso, consome tempo e trabalho e, por conseguinte, utilizado em poucos estudos para confirmação dos dados de prevalência e para medir a precisão de microscopia e TDRs (Fançonny, *et al.*, 2013).

A reação antígeno-anticorpo é de grande importância em medicina laboratorial, pois diversos tipos de ensaios baseiam-se no uso *in vitro* de anticorpos gerados em laboratório e dirigidos para antígenos específicos.

O método de *ELISA* (do inglês *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) é um teste imunoenzimático que permite a deteção de anticorpos específicos. Este teste é usado no diagnóstico de várias doenças que induzem a produção de imunoglobulinas. Um imunoensaio que usa anticorpos específicos para detetar antígenos e anticorpos. O complexo que contém o anticorpo é visualizado pelo acoplamento da enzima ao anticorpo. A adição de substrato ao complexo enzima-anticorpo-antígeno resulta num produto colorido.

Dentre os diversos tipos de *ELISA* (indireto, “sanduíche” e competição e captura), destacam-se o *ELISA* indireto e o sanduíche.

O método de *ELISA* indireto é uma técnica bioquímica utilizada em imunologia para detetar a presença de anticorpos específicos em amostras de soro. É usado no diagnóstico de várias doenças que induzem a produção de anticorpos (Figura 11).



**Figura 11:** Esquema ilustrativo do *ELISA* indireto. Adaptado de (Burmester & Pezzutto, 2005).

Os antígenos são moléculas capazes de iniciar uma resposta imune, a qual começa pelo reconhecimento dos linfócitos e consequente produção de um anticorpo específico.

A porção Fc constitui o domínio efetor das imunoglobulinas responsável por condicionar as características de algumas respostas imunológicas por parte do hospedeiro. Para tal, deve fornecer locais de ligação quer para recetores celulares quer para complemento. O tipo de resposta efetora depende do tipo de imunoglobulina. Estes diferentes tipos de resposta efetora incluem opsonização, ativação do complemento, citotoxicidade celular dependente de anticorpos ou ADCC e transcitose (Arosa, *et al.*, 2007).

### 1.7 Terapêutica da malária e suas limitações

Quer um indivíduo desenvolva uma malária ligeira, moderada ou grave, é em parte dependente de um balanço entre a proteção da imunidade e da imunopatologia. Contudo, os fatores que levam a imunidade do hospedeiro na direção quer da proteção quer da patologia, contribuindo para a suscetibilidade diferencial e resposta à malária ainda não são bem compreendidos. Uma compreensão mais abrangente sobre como os componentes imunes interagem no hospedeiro com os parasitas da malária *Plasmodium spp.* pode melhorar a gestão e o desenho de novos agentes imunoterapêuticos. (Chua, *et al.*, 2012).

A compreensão dos mecanismos que permitem o escape a defesas imunes do hospedeiro por parte dos protozoários, nomeadamente do *Plasmodium*, será um passo importante para a obtenção de estratégias vacinais que possam ser eficazes no combate à infeção causada por este parasita, para o qual ainda não existe nenhuma vacina eficaz em humanos. Ainda está em estudo a vacina antimalárica (presentemente em ensaios clínicos de Fase 3), que se pensa irá ter três antígenos parasitários e poderá vir a substituir a profilaxia tradicional. Esta tem apresentado resultados promissores (Palma Dos Reis, *et al.*, 2012).

A permanência do desenvolvimento de estratégias de proteção imune contra este tipo de infeções é também ressaltada pelo facto de se ter vindo a assistir à emergência de estirpes parasitárias resistentes a drogas utilizadas para as combater (Arosa, *et al.*, 2007).

Recentemente verifica-se aumento de resistências, quer do vetor da infeção aos inseticidas utilizados, quer dos parasitas, particularmente do *Plasmodium falciparum*, aos antimaláricos, nomeadamente à cloroquina e pirimetamina-sulfadoxina (Palma Dos Reis, *et al.*, 2012).

Em resposta ao crescimento da resistência a antimaláricos *standard*, a terapia combinada à base de artemisinina está a ser introduzida como uma droga de primeira linha em grande parte da subsaariana (Lubell, *et al.*, 2007). Um problema para o futuro é o da resistência à artemisinina - o componente essencial das combinações terapêuticas baseadas na artemisinina, a qual foi detetada em quatro países da Região do Sudeste Asiático, concomitante com a resistência do mosquito aos inseticidas, já observada em 64 países a volta do mundo (OMS, 2012).

Apesar do aumento do número de TDRs e de terapêuticas combinadas à base de artemisinina disponibilizados continuam a ser muitos os casos de febre que são ainda tratados com antipalúdicos com base num diagnóstico de presunção, sem diagnóstico

parasitológico, e nem todos os casos de paludismo confirmado recebem um tratamento adequado, com um antipalúdico de qualidade comprovada (OMS, 2012).

A profilaxia da malária é recomendada nas viagens a países com regiões endêmicas de malária, sendo mandatória quando se visitam essas mesmas regiões. A profilaxia tem duas vertentes; a profilaxia química com cloroquina, mefloquina, doxiciclina, ou atavaquone-proguanil, e a redução da exposição ao vetor da infecção (Palma Dos Reis, *et al.*, 2012).

Duas grandes classes de fármacos estão disponíveis para o tratamento da malária: os alcalóides derivados da cinchona (quinina e quinidina), e os derivados da artemisina (artesunato). Em regiões onde o artesunato endovenoso está disponível, este é o fármaco preferencial no tratamento da doença grave por eliminar mais rapidamente a parasitêmia e atuar em todas as fases do ciclo de vida do parasita, proporcionando melhoria clínica rápida e diminuição da transmissão cruzada da malária. O artesunato endovenoso é considerado o fármaco de primeira linha para o tratamento dos casos de malária grave em zonas não endêmicas. Nos locais onde o artesunato endovenoso não está disponível ou aprovado, o dicloridrato de quinina endovenoso ou o sulfato de quinina oral serão a primeira escolha. Para minimizar o risco de resistência dos parasitas à terapêutica, é proposta a associação com outro antimalárico de mecanismo de ação diferente, como por exemplo a doxiciclina. Em Portugal está já disponível a associação mefloquina-artesunato em formulação oral para o tratamento de malária não grave e também para profilaxia (Askling, *et al.*, 2012).

As indicações para exsanguíneo-transfusão são controversas, pois se por um lado lhe são atribuídas propriedades de redução rápida da parasitêmia, diminuição do risco de hemólise intravascular, melhoria da circulação sanguínea, remoção de citocinas e melhoria da capacidade de transporte de oxigénio, por outro não existem ainda estudos controlados suficientes para apoiar esta abordagem. Embora as recomendações da OMS não sugiram a exsanguíneo-transfusão, o *Centers for Disease Control and Prevention* recomenda a sua consideração em doentes com parasitêmia superior a 10% ou com disfunção grave de órgão (Palma Dos Reis, *et al.*, 2012).



## 2. Objetivos

Dos doentes infetados, apenas um pequeno grupo desenvolve doença grave, que os coloca em risco de vida, sendo os restantes casos assintomáticos ou com pouca gravidade.

Os mecanismos que determinam a progressão para doença grave em determinadas pessoas e a sua forma de apresentação em cada indivíduo continuam por explicar, existindo cada vez mais dados que atribuem uma importância primordial ao papel dos mediadores inflamatórios na fisiopatologia da malária grave.

Estudos em humanos e em modelos animais, têm demonstrado que a resposta imunitária dirigida a antígenos da fase eritrocitária pode ser protetora e facilitar o controlo da infeção. A imunização com antígenos da fase eritrocitária, principalmente antígenos de merozoítos, tem-se mostrado protetora em vários modelos animais e com algum efeito protetor em seres humanos (Genton, *et al.*, 2002).

### 2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo prende-se na análise do perfil de anticorpos anti-*Plasmodium falciparum* e citocinas pró-inflamatórias em indivíduos com clínica suspeita de malária.

### 2.2. Objetivos Específicos

Pretende-se:

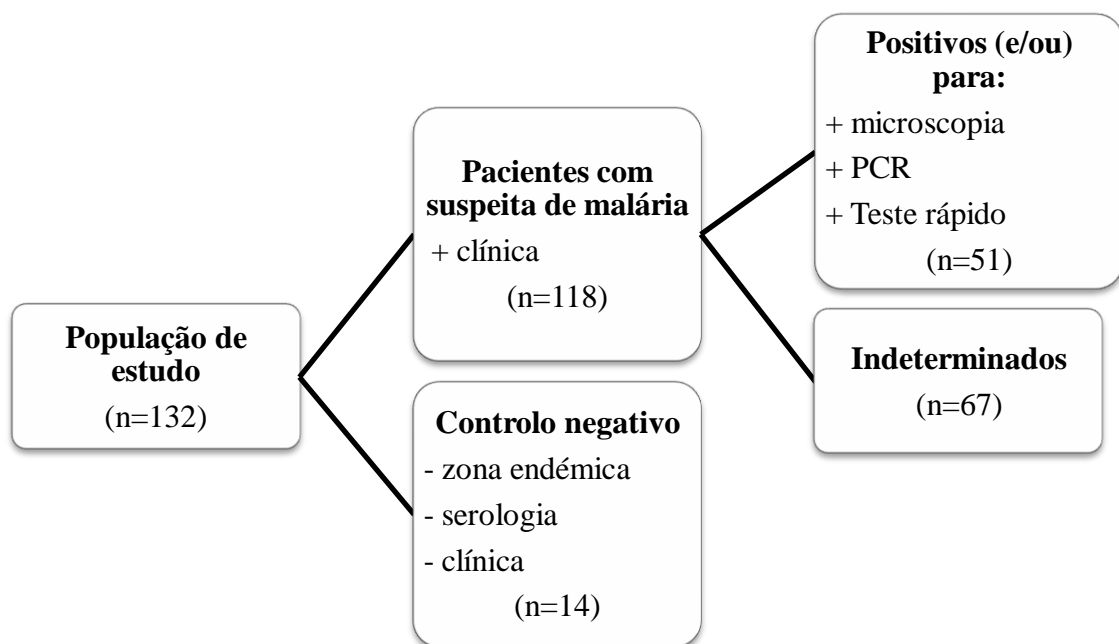
- 1) Caracterizar a população estudada socio-demograficamente e procurar relacioná-la com a sintomatologia apresentada em indivíduos com suspeita clínica de malária;

- 2) Determinar os níveis séricos de anticorpos totais anti-*Plasmodium spp.* e anticorpos específicos para *P. falciparum* numa população com clínica suspeita de malária;
- 3) Caracterizar o perfil de resposta imune do tipo Th1 versus Th2 baseado na pesquisa de anticorpos anti-*P. falciparum* do tipo IgG1, IgG3 e IgG4;
- 4) Estudar o processo de ativação do sistema complemento em pacientes com clínica suspeita de malária, pela determinação dos níveis de anafilatoxina C5a e proteína C reativa (CRP);
- 5) Determinar os níveis séricos da citocina pró-inflamatória IFN- $\gamma$  em soros de pacientes com quadro clínico suspeito de malária.

### 3. Material e Métodos

#### 3.1 População de estudo

Para o estudo executado, foram utilizados os soros de pacientes potencialmente expostos a *P. falciparum*, bem como soros negativos (controlo). Na sua maioria, são adultos que estiveram em diferentes regiões endémicas do continente africano, entre as quais Angola, Moçambique, Guiné, São Tomé, Gabão e Congo. Alguns soros são de indivíduos que estiveram temporariamente na Índia. Por se tratar de um estudo exploratório, o cálculo estatístico do tamanho da amostragem não foi estabelecido, fazendo parte desta, todas as amostras que reuniram os critérios de inclusão para o referido estudo.



**Figura 12:** Esquema ilustrativo da população de estudo.

Foram utilizados 118 soros de pacientes, reportados como pacientes com clínica suspeita de malária. Como controlo negativo foram utilizados 14 soros de indivíduos portugueses saudáveis que nunca estiveram em regiões endémicas de malária.



Os critérios de inclusão tidos em conta foram então: (1) admissão nas consultas de pós-viagem do Instituto de Higiene e Medicina Tropical; (2) com quadro clínico suspeito de malária; (3) e idade superior a 16 anos.

Para a recolha de dados foi utilizado o formulário do Laboratório de Patologia Tropical do IHMT/UNL. O formulário incluía os principais dados do paciente (nome, idade, género), estadia em país tropical e dados de estudos laboratoriais efetuados após a consulta.

Todos os soros foram obtidos na Unidade de Ensino e Investigação de Clínica das Doenças Tropicais do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa. As amostras utilizadas foram obtidas e tratadas de acordo com as recomendações do Comité de Ética do IHMT/UNL (ver Anexo I).

### **3.2 Obtenção de dados laboratoriais**

Após colheita de sangue para tubos com EDTA-K3 para hematologia, feita pelos técnicos de análises clínicas do IHMT, foi realizado o hemograma através do equipamento *ABACUS JUNIOR*.

Foi feita uma avaliação da parasitémia em gota espessa de sangue periférico no IHMT, corado pelo método de Giemsa, para confirmação diagnóstica, tendo, os resultados, sido dados em termos qualitativos (positivo para a presença dos parasitas e negativo perante a sua ausência).

### **3.3 Tratamento de amostras sanguíneas para ensaios imunoenzimáticos**

Na realização de ensaios imunoenzimáticos para a quantificação de componentes proteicos que constituem o sistema imunitário são utilizadas amostras de soro e plasma. Para a quantificação de tais componentes, para este estudo, foram primeiramente obtidas amostras através da colheita de sangue total. As amostras foram seguidamente fracionadas em tubos que posteriormente foram centrifugados sob refrigeração a uma

rotação de 10.000 rpm por 30 min. Posteriormente, o sobrenadante foi misturado na proporção de 1:1 (v/v) em solução de preservação (0,05 M de Tris-HCl pH 8,0 contendo 1 mM de cloreto de magnésio e 15 mM de azida sódica). A seguir, a mistura foi armazenada a -20°C até ao momento da utilização.

### **3.3.1 Parasitas (*Plasmodium falciparum*)**

Para a análise serológica e imunoquímica de potenciais antigénios para a pesquisa de anticorpos contra *Plasmodium falciparum* em pacientes com malária utilizou-se a estirpe 3D7 de *P. falciparum*, gentilmente cedida pela Investigadora Doutora Fátima Nogueira da UEI Parasitologia Médica, IHMT/UNL. O genoma nuclear do *P. falciparum* 3D7 tem 23,3 Mb de tamanho, cariótipo de 14 cromossomas e cerca de 5,300 genes (Tuteja, 2007).

### **3.3.2 Cultura *in vitro* de *Plasmodium falciparum***

O cultivo *in vitro* dos clones de *P. falciparum*, foi efetuado de acordo com os métodos descritos por Costa, *et al.* (2013). Este tipo de cultura de plasmódios consiste na manutenção dos eritrócitos, em meio de cultura RPMI 1640 completo, com um hematócrito de 5%, 37°C e atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. O desenvolvimento dos parasitas foi avaliado pela observação por microscopia ótica, de esfregaços sanguíneos corados com Giemsa a 20%, efetuando-se diluições e novas culturas, quando a parasitémia atinge cerca de 8-10% de eritrócitos parasitados.

A partir dos doadores humanos saudáveis, isentos de qualquer tipo de medicação, colheram-se 10 a 20 ml de sangue venoso em seringa com EDTA. O sangue foi dividido em alíquotas de 5 ml, e centrifugado a 2000 rpm/5 min, junto com o sobrenadante, é eliminada a fração correspondente aos glóbulos brancos. A cada tubo são adicionados 10 ml de meio RPMI incompleto (sem o substituto do plasma AlbuMaxII), misturado por inversão, centrifugado a 2000 rpm/5 min e eliminado o sobrenadante, este passo é repetido 2 a 3 vezes. Ao *pellet* de eritrócitos é adicionado um volume igual de meio

RPMI completo. Esta suspensão de eritrócitos (50%), é conservada a 4°C, durante um período máximo de 15 dias.

### **3.3.3 Extração e quantificação das proteínas totais de *Plasmodium falciparum***

Culturas com cerca de 10% de parasitemia, foram centrifugadas a 5000 rpm, durante 5 min, à temperatura ambiente, e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se PBS gelado ao *pellet*, e a mistura foi novamente centrifugada a 5000 rpm durante 5 min, à temperatura ambiente. Descartou-se o sobrenadante e os eritrócitos depositados foram lisados por adição de igual volume de uma solução de 0,2% de saponina em PBS, e incubação 20 min a 37°C. Esta mistura foi centrifugada a 10.000 rpm a 4°C durante 10 min, o sobrenadante descartado e os parasitas lavados 3 vezes com PBS gelado, seguindo-se nova centrifugação a 10.000 rpm, 4°C, 10 min. Posteriormente, lisaram-se os parasitas, para a extração de todas as suas proteínas. Para tal, adicionou-se tampão de lise, homogeneizou-se bem no vórtex e centrifugou-se 15 minutos a 10.000 rpm a 50C, recuperou-se o sobrenadante, descartando a hemozoína.

Após a obtenção do extrato total de proteínas de *P. falciparum* procedeu-se à sua quantificação pelo método de Bradford. O método de *Bradford* é uma técnica para a determinação de proteínas totais que utiliza o corante de *Coomassie brilliant blue* G-250. Este método é baseado na interação entre o corante G-250 e as proteínas. No pH de reação, a interação entre a proteína e o corante G-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente a 595nm (BioRad). Através de uma curva de calibração efetuada com albumina do soro bovino (BSA 2mg/mL) é calculada a concentração proteica.

### **3.4 Determinação de anticorpos totais anti-*Plasmodium spp.* em pacientes com quadro clínico suspeito de malária**

De forma a discriminar a população positiva e negativa foi utilizado um kit de *ELISA* comercial anti-*Plasmodium spp* (Teste EIA Malária 96 e 480 - BioRad). Este sistema utiliza quatro antígenos recombinantes específicos para as quatro principais espécies de

*Plasmodium spp.*. Os antígenos detetam anticorpos do tipo IgG, IgM e o IgA específicos de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae* permitindo ao teste detetar anticorpos durante todas as fases da infeção. Todos os reagentes são fornecidos pelo kit. O procedimento utiliza amostras não diluídas de soro ou plasma.

O kit *MALARIA EIA TEST KIT* (BioRad), inclui um controlo positivo e outro negativo (soros humanos), conjugado (antígenos recombinantes conjugados com peroxidase de rábano), tampão conjugado diluído (solução de tampão salina contendo surfactante e estabilizadores), substrato (peróxido de ureia e tetrametilbenzidina), solução de lavagem (20 x concentrada, solução salina contendo surfactante).

As placas de *ELISA* têm adsorvidos aos poços uma mistura dos antígenos recombinantes de *Plasmodium spp.* Inicialmente adicionou-se 50µL/poço das amostras não diluídas, bem como dos controlos negativos e positivos. Incubou-se a placa durante 30 minutos a 37°C. De seguida, lavou-se a placa 5 vezes com 200µL/poço de tampão de lavagem e incubou-se a placa com o 50µL/poço de conjugado diluído 1:10 (v/v) em tampão de conjugado durante 30 minutos a 37°C. Passados os 30 minutos, lavou-se a placa cinco vezes com 200µL/poço de tampão de lavagem. Adicionou-se 50µL/poço de substrato/cromogénio e incubou-se à temperatura ambiente durante 30 minutos. Como o substrato é fotossensível, a placa é incubada, durante esses 30 minutos ao abrigo da luz. Após a incubação com o substrato, adicionou-se 50µL/poço de solução de *STOP* (ácido sulfúrico 0,5M). A leitura dos resultados é feita num leitor de microplacas a 450 nm.

O valor de *cut-off*, de acordo com o manual de instruções do Kit (BioRad), é calculado através da média das ODs obtidas dos controlos negativos, em triplicado, divididas por 3, mais 0,100 de acordo com a fórmula abaixo apresentada:

$$\frac{\text{Controlo negativo 1} + \text{CN2} + \text{CN3}}{3} + 0,100$$

O critério de validação do *ELISA* comercial é o seguinte: (1) a absorvência de cada controlo negativo deverá ser igual ou inferior a 0,080. Se algum dos controlos der acima deste valor, a leitura deve ser ignorada e o *cut-off* deve ser calculado com base nos dois

restantes valores de controlos negativos; (2) a absorvência de cada controlo positivo deverá ser maior ou igual a 1.000.

Interpretação: Amostras com valores de absorvência menor que o valor de *cut-off* são consideradas negativas pelo *MALARIA EIA TEST KIT*. Amostras cujo valor de absorvência só seja 10% abaixo do valor do *cut-off*, devem ser interpretadas com cuidado. É necessário repetir o procedimento, em duplicado. As amostras com valores superiores ao *cut-off* são consideradas positivas pelo *MALARIA EIA TEST KIT*.

Neste estudo os dados aparecem representados como a razão entre as médias das ODs (do inglês *Optical Density*) obtidas a dividir pelo valor de *cut-off* obtido a cada ensaio. Logo:

$$\frac{OD}{Cut-off} > 1 \quad \Rightarrow \quad \text{Amostra positiva}$$

$$\frac{OD}{Cut-off} < 1 \quad \Rightarrow \quad \text{Amostra negativa}$$

### 3.5 Determinação de anticorpos do tipo IgM e IgG específicos para *Plasmodium falciparum*

O tipo de ensaio utilizado neste estudo foi o *ELISA* indireto.

Foi avaliada a presença de anticorpos totais do tipo IgM e IgG anti-*P.falciparum*, (resposta secundária, de forma a seleccionar os soros mais reativos, na população discriminada pelo *ELISA* comercial). A análise da presença destes dois tipos específicos de anticorpos servirá de comparação entre o *ELISA* anti-*P.falciparum* e o *ELISA* comercial anti-*Plasmodium spp*. A determinação anticorpos anti-*P.falciparum* foi realizada de acordo com o protocolo estabelecido por Costa, 2013.

Utilizaram-se as proteínas totais de *P. falciparum* como antígeno na pesquisa de anticorpos totais (IgG+IgA+IgM), do tipo IgG totais e IgM em soros de pacientes potencialmente expostos a *P. falciparum*.

Adsorveu-se à placa 100 ng/poço de extrato proteico de *P.falciparum* (antigénio) dissolvido em tampão bicarbonato (0,1M a pH 8,5). Cada poço levou um volume de 100 µL. Incubou-se a placa com antigénio, durante a noite a 4 °C. Após incubação, lavou-se a placa três vezes, com 200 µL de tampão de lavagem por poço, para a remoção do excesso de antigénio que não foi adsorvido à placa. De seguida, incubou-se a placa com 200 µL/poço de tampão de bloqueio, durante uma hora à temperatura ambiente e com agitação orbital, com o objetivo de reduzir a ocorrência de ligações inespecíficas. Lavou-se a placa três vezes com 200 µL/poço, com tampão de lavagem. De seguida, incubou-se a placa com 100 µL/poço de solução de anticorpo primário (soros controlo negativo), em duplicado, em diluição 1:100, em tampão de anticorpo, durante uma hora à temperatura ambiente, com agitação orbital. Esta incubação permitiu a ligação do anticorpo, presente no soro, ao antigénio adsorvido à placa e as diluições seriadas permitiram identificar a melhor diluição de soro a utilizar neste estudo. Após o período de incubação com as amostras de soros, a placa foi lavada cinco vezes com 200 µL de tampão de lavagem, com o objetivo de remover o excesso de anticorpos que não ficaram ligados ao antigénio adsorvido à placa. Para a deteção dos anticorpos primários totais IgM e IgG anti-*P. falciparum* a placa foi incubada com 100 µL/poço de anticorpos secundários (do tipo IgG+A+M) conjugados com fosfatase alcalina (1:1000), anticorpos secundários anti-IgG humana conjugados com fosfatase alcalina (1:5000), e anticorpo secundário do tipo IgM conjugado com fosfatase alcalina (1:5000), respetivamente durante 1h à temperatura ambiente e com agitação orbital. De seguida, fizeram-se cinco lavagens, cada uma com 200 µL/poço de tampão de lavagem, para remover o excesso de anticorpo secundário que não ficou ligado ao anticorpo primário. Para revelar a presença do conjugado, antigénio-anticorpo primário-anticorpo secundário, para IgG+A+M, IgG e IgM incubou-se a placa com 100 µL/poço de solução de substrato p-nitrofenil-fosfatase na concentração de 1 µg/ml diluído em tampão dietanolamina 10%, produzindo uma substância cromófora. Para parar a reação, utilizou-se o ácido sulfúrico 4N, que vai inibir a atividade do enzima através da desnaturação pela variação do pH. A leitura dos resultados é feita num leitor de microplacas a 415 nm (IgM) e a 490nm (Ig totais e IgG).

Todos os soros de pacientes com suspeita clínica de malária foram analisados de acordo com o mesmo procedimento, já com as diluições selecionadas para cada tipo de anticorpo.

### 3.6 Determinação de anticorpos IgG1, IgG3 e IgG4 anti-*Plasmodium falciparum*

Determinou-se a presença de subtipos (IgG1, IgG3, IgG4) de anticorpos específicos para *P. falciparum* nas amostras de soro dos pacientes com malária de acordo com o protocolo estabelecido por Costa, *et al.*, (2013), com algumas modificações necessárias através do extrato proteico total de *P. falciparum* que foi adsorvido (200 ng/poço) em placas de *ELISA* (Nunc - Dinamarca) em tampão bicarbonato 0,1M pH 8,5. Cada poço levou de volume 100 µl do extrato proteico na concentração final de 200 ng/ poço. Incubou-se a placa com antígeno, durante a noite a 4°C. Após incubação, lavou-se a placa três vezes, com 200 µl de tampão de lavagem (PBS-Tween 0,05%) por poço, para a remoção do excesso de antígeno que não foi adsorvido à placa. De seguida, incubou-se a placa com 200 µl/poço de tampão de bloqueio (PBS-BSA 1%), durante uma hora à temperatura ambiente e com agitação orbital, com o objetivo de reduzir a ocorrência de ligações inespecíficas. Lavou-se a placa três vezes com 200 µl/poço, com tampão de lavagem. Após isto, incubou-se a placa com 100 µl/poço de diferentes concentrações das amostras de soro diluídas em tampão de anticorpo (PBS-BSA 0,1%-Tween 0,05%), em duplicado, em diluição de 1:50 durante uma hora à temperatura ambiente, com agitação orbital. Esta incubação permitiu a ligação do anticorpo, presente na amostra, ao antígeno adsorvido à placa e as diluições seriadas permitiram identificar a melhor diluição das amostras de sangue a utilizar neste estudo. Após o período de incubação com as amostras de soros, a placa foi lavada cinco vezes com 200 µl de tampão de lavagem, com o objetivo de remover o excesso de anticorpos que não ficaram ligados ao antígeno adsorvido à placa. Para a deteção do anticorpo anti-*P. falciparum* a placa foi incubada com 100 µl/poço dos seguintes anticorpos: anti-IgG1 conjugado com biotina (1:1000) (Sigma - EUA), anti-IgG3 conjugado com biotina (1:1000) (Sigma - EUA), e anti-IgG4 conjugado com biotina (1:1000) (Sigma – EUA); durante 1h à temperatura ambiente e com agitação orbital. De seguida, fizeram-se cinco lavagens, cada uma com 200 µl/poço de tampão de lavagem, para remover o excesso de anticorpo conjugado que

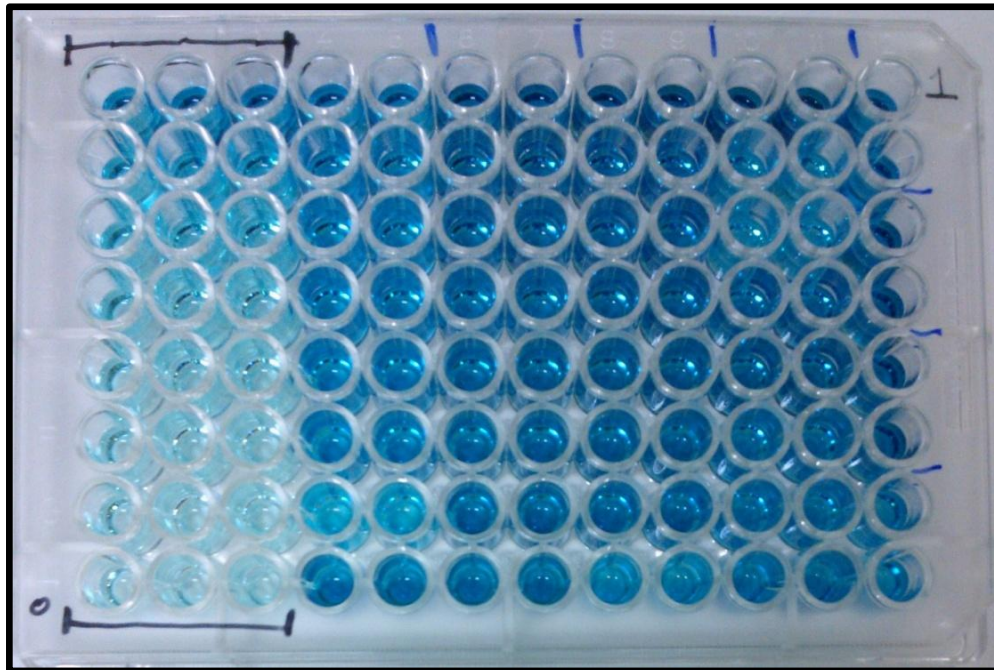
não ficou ligado ao anticorpo primário. Seguidamente adicionou-se 100 µl/poço do conjugado peroxidase-estreptavidina (1:2000) durante 30 min, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.. A estreptavidina vai ligar-se à biotina na “vizinhança” do anticorpo, revestindo-o com peroxidase. Para revelar a presença do conjugado, antígeno-anticorpo primário-anticorpo secundário, incubou-se a placa com 100 µl/poço de solução de substrato (10 mL de tampão de citrato com 10 mg de orto-phenylenediamine e 10 µl de peróxido de hidrogénio 30% v/v) durante 30 min, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A enzima HRP na presença de peróxido de hidrogénio que catalisa a reação da orto-phenylenediamine (OPD), produzindo uma substância cromófora que absorve a 490 nm. Para parar a reação, utilizou-se o ácido sulfúrico 4N, que vai inibir a atividade da enzima através da desnaturação pela variação do pH. Os resultados de reatividade foram analisados em função da densidade ótica obtida por cada amostra. A leitura dos resultados é feita num leitor de microplacas a 450 nm.

### 3.7 Determinação das proteínas solúveis C5a e CRP

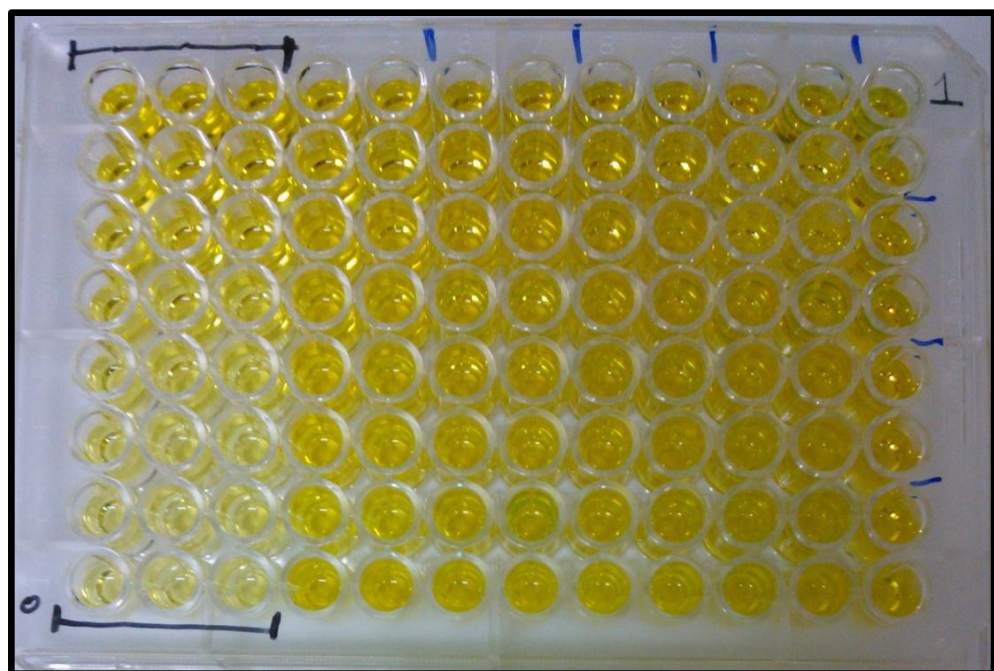
As proteínas solúveis C5a e CRP (do inglês *C Reactive Protein*) foram determinadas nas amostras de soro através do kit comercial DuoSet *ELISA* (R&D Systems - EUA). Os kits baseiam-se na reação imunoenzimática (*ELISA*), onde a proteína recombinante C5a e CRP respetivamente é utilizada na elaboração de uma curva padrão expressa em pg/mL. Resumidamente, as amostras de soro são submetidas à placa de *ELISA*, posteriormente tratada com anticorpo monoclonal anti-C5a/anti-CRP. A proteína C5a/CRP presente nas amostras de sangue é “capturada” pelos anticorpos específicos anti-C5a/ anti-CRP anteriormente adsorvidos à placa. Após a lavagem, os anticorpos anti-C5a/anti-CRP, agora conjugados com biotina são utilizados a seguir formando assim o sistema de *ELISA* conhecido por *ELISA-Sandwich*. Posteriormente, adiciona-se à reação estreptavidina conjugada com HRP (do inglês *horseradish-peroxidase*) e a seguir à última lavagem o substrato específico para cada tipo de reação. Determinou-se uma curva padrão para cada proteína a quantificar e os resultados das amostras foram obtidas em pg/mL.



(A)



(B)



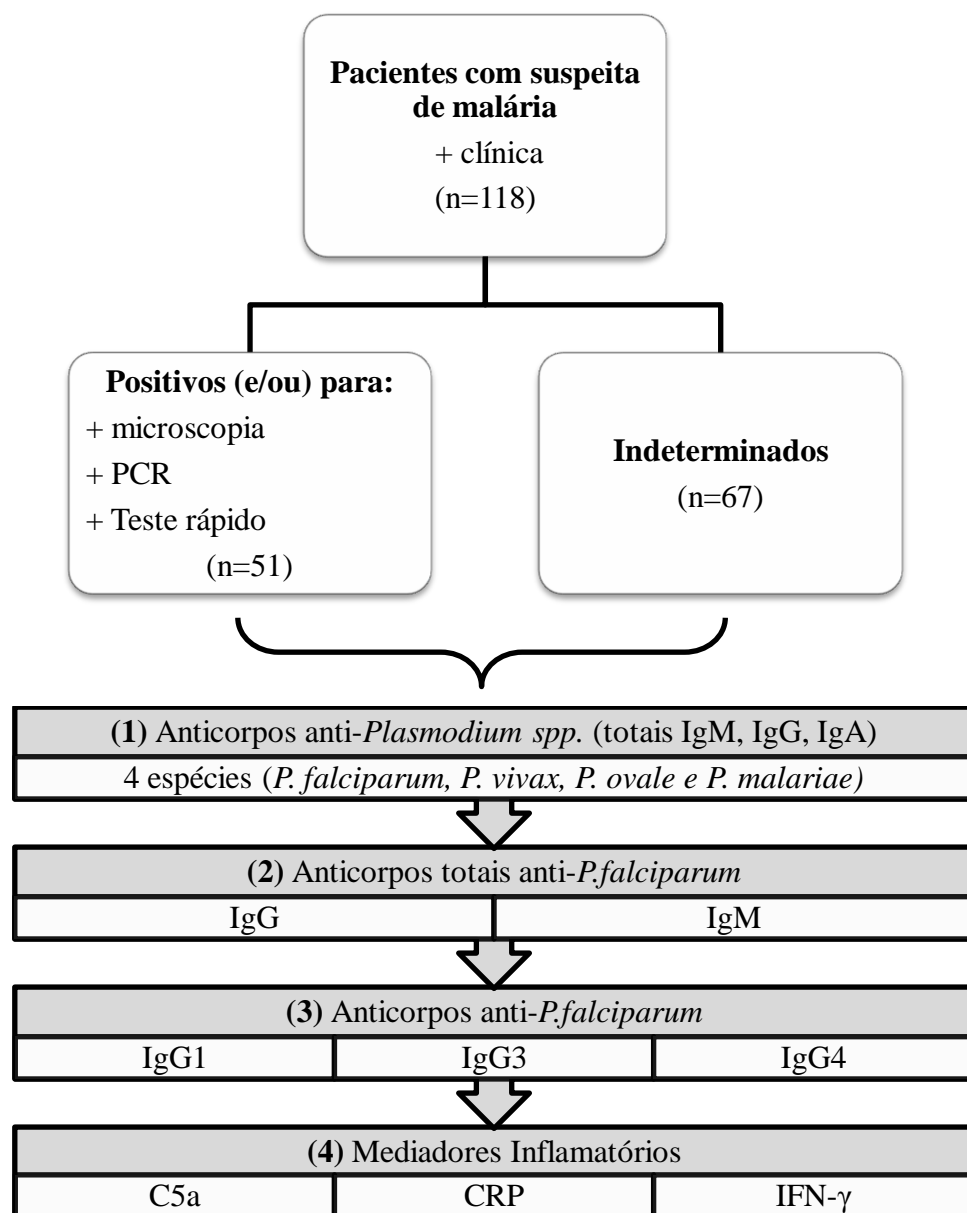
**Figura 13:** (A) Placa de *ELISA* após adição de substrato. (B) Placa de *ELISA* após adição de solução *STOP* ( $\text{H}_2\text{O}+\text{H}_2\text{SO}_4$ ).

### 3.8 Determinação da citocina pro-inflamatória IFN- $\gamma$

A citocina pro-inflamatória IFN- $\gamma$  foi determinada nas amostras de soro através do kit comercial DuoSet ELISA (*R&D Systems* - EUA). O kit baseia-se na reação imunoenzimática (*ELISA*), onde a citocina IFN- $\gamma$  é utilizada na elaboração de uma curva padrão expressa em pg/mL. As amostras de soro são submetidas à placa de *ELISA*, posteriormente tratada com anticorpo monoclonal anti-IFN- $\gamma$ . A citocina presente nas amostras de soro é “capturada” pelos anticorpos específicos anti-IFN- $\gamma$  anteriormente adsorvidos à placa. Após a lavagem, os anticorpos anti-IFN- $\gamma$ , agora conjugados com biotina são utilizados a seguir formando assim o sistema de *ELISA* conhecido por *ELISA-Sandwich*. Posteriormente, adiciona-se à reação estreptavidina conjugada com HRP e a seguir a última lavagem o substrato específico para cada tipo de reação. Determinou-se uma curva padrão para cada proteína a quantificar e os resultados das amostras foram obtidas em pg/mL.

#### 4. Resultados e Discussão

Após terem sido aplicados os critérios de inclusão (Material e Métodos, 3.1) foram recrutadas para o estudo 118 amostras (soro) de pacientes com suspeita de malária e 14 amostras de indivíduos portugueses saudáveis que nunca estiveram em regiões endêmicas de malária (controlo negativo).



**Figura 14:** Esquema ilustrativo da metodologia do estudo e parâmetros determinados.

Dos soros dos pacientes com suspeita clínica de malária foram utilizados 51 soros identificados como positivos (por microscopia positiva, PCR positivo e/ou teste rápido positivo), e 67 soros identificados como indeterminados (por ausência/inconclusão de microscopia, PCR e/ou teste rápido). A estas 118 amostras de soro determinou-se: (1) anticorpos anti-*Plasmodium spp.* (totais IgM, IgG e IgA) para 4 espécies (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae*); (2) anticorpos totais anti-*P. falciparum* (IgM e IgG); (3) anticorpos anti-*P. falciparum* (IgG1, IgG3 e IgG4); (4) e os mediadores inflamatórios C5a, CRP e IFN- $\gamma$ .

#### 4.1 Características sociodemográficas

Para o estudo das características sociodemográficas foram utilizados os dados do formulário do Laboratório de Patologia Tropical do IHMT/UNL que incluía os principais dados do paciente (nome, idade, género), estadia em país tropical e dados de estudos laboratoriais efetuados após a consulta.

Dos pacientes recrutados para o estudo, 67,8% (n=80) são do sexo masculino e 32,2% (n=38) são do sexo feminino. Do grupo controlo 35,7% (n=5) são do sexo masculino e 50% (n=7) são do sexo feminino sendo que 14,3% (n=2) não tem referência de género. Os dados apresentados podem ser consultados na tabela 5.

Relativamente à idade dos pacientes, a sua maioria 33,9% (n=40) encontra-se entre os 18 e os 30 anos, seguidos dos 22,9% (n=27) com idades entre os 51 e os 60 anos e de 21,2% (n=25) com idades entre os 31 e os 40 anos. Apenas um paciente apresenta idade inferior a 18 anos. Os dados apresentados podem ser consultados na tabela 5.

**Tabela 5:** Género, idade, sintomatologia e países para onde viajaram os diferentes grupos em estudo.

		Pacientes		Controlo	
		Frequência relativa (n)	Frequência absoluta (%)	Frequência relativa (n)	Frequência absoluta (%)
<b>Género</b>	Masculino	80	67,8	5	35,7
	Feminino	38	32,2	7	50
	ND	0	0,0	2	14,3
<b>Idade (anos)</b>	16-18	1	0,8	0	0,0
	18-30	40	33,9	8	57,1
	31-40	25	21,2	2	14,3
	41-50	20	16,9	2	14,3
	51-60	27	22,9	0	0,0
	>61	5	4,2	2	14,3
<b>Países para onde viajaram</b>	Angola	59	50,0	Não aplicável	
	Guiné	7	5,9		
	Moçambique	11	9,3		
	Índia	1	0,8		
	Gabão	1	0,8		
	Congo	1	0,8		
	São Tomé e Príncipe	2	1,7		
	Outro	36	30,5		
<b>Sintoma-tologia</b>	Febre	19	16,1	Não aplicável	
	Cefaleia	4	3,4		
	Dores articulares	2	1,7		
	Vómitos	2	1,7		
	Mialgias	3	2,5		
	Diarreia	2	1,7		
	ND	95	80,5		

ND: Não documentado

São definidos como casos de malária importada aqueles que sendo adquiridos numa área endémica, por nativos ou turistas, são diagnosticadas numa área não endémica (Palma Dos Reis, *et al.*, 2012). Foram consultados os destinos dos pacientes cujas amostras deram entrada no laboratório de patologia tropical do IHMT. A grande maioria dos pacientes, 68,5% (n=81), viajou para o continente africano tendo sido apenas registada uma viagem para o continente Indiano. O país com maior número de viajantes

foi Angola, 50,0% (n=59), seguido de Moçambique, 9,3% (n=11), Guiné, 5,9% (n=7) e São Tomé e Príncipe com 1,7% (n=2). Foram também registados como destinos os países Gabão e Congo, cada um com 0,8% (n=1). Do total dos pacientes, 30,5% (n=36) não refere o país endémico para malária para onde viajou. Os dados apresentados podem ser consultados na tabela 5.

#### **4.2 Apresentação clínica da população estudada**

A apresentação clínica da malária é muito variável, podendo apresentar desde casos pauci-sintomáticos até formas agudas e muito graves (Palma Dos Reis, *et al.*, 2012). No entanto, numa proporção dos pacientes, particularmente em pessoas não imunes e/ou em que o tratamento foi adiado ou tratado ineficazmente (cloroquina na maioria das áreas do mundo), a doença coloca o paciente em risco de vida podendo haver necessidade de hospitalização, terapia com antimalárico parenteral, e o tratamento de complicações (Day & Dondorp, 2007).

A malária grave pode ser clinicamente indistinguível de outras doenças comuns, incluindo pneumonia, meningite, e sepsis (Gwer, *et al.*, 2007). O erro de diagnóstico da malária é comum tanto na identificação de doenças simples (a doença febril) como no diagnóstico de malária grave ou complicada (Koram & Molyneux, 2007).

Os dados clínicos dos pacientes estudados referem-se a manifestações sintomáticas (tabela 5). O sinal mais frequente foi o de febre, 16,1% (n=19). Outros sintomas documentados foram os de cefaleia, encontrados em 3,4% (n=4) dos pacientes, mialgias em 2,5% (n=3) dos pacientes e casos de dores articulares e vômitos presentes em 1,7% (n=2). Do total de pacientes incluídos neste estudo, 80,5% (n=95) não tem qualquer sintoma documentado na ficha clínica.

#### **4.3 Avaliação dos dados hematológicos**

A anemia por malária severa (AMS) é uma das principais causas de internamento e mortalidade na África Subsaariana (Obonyo, *et al.*, 2007).

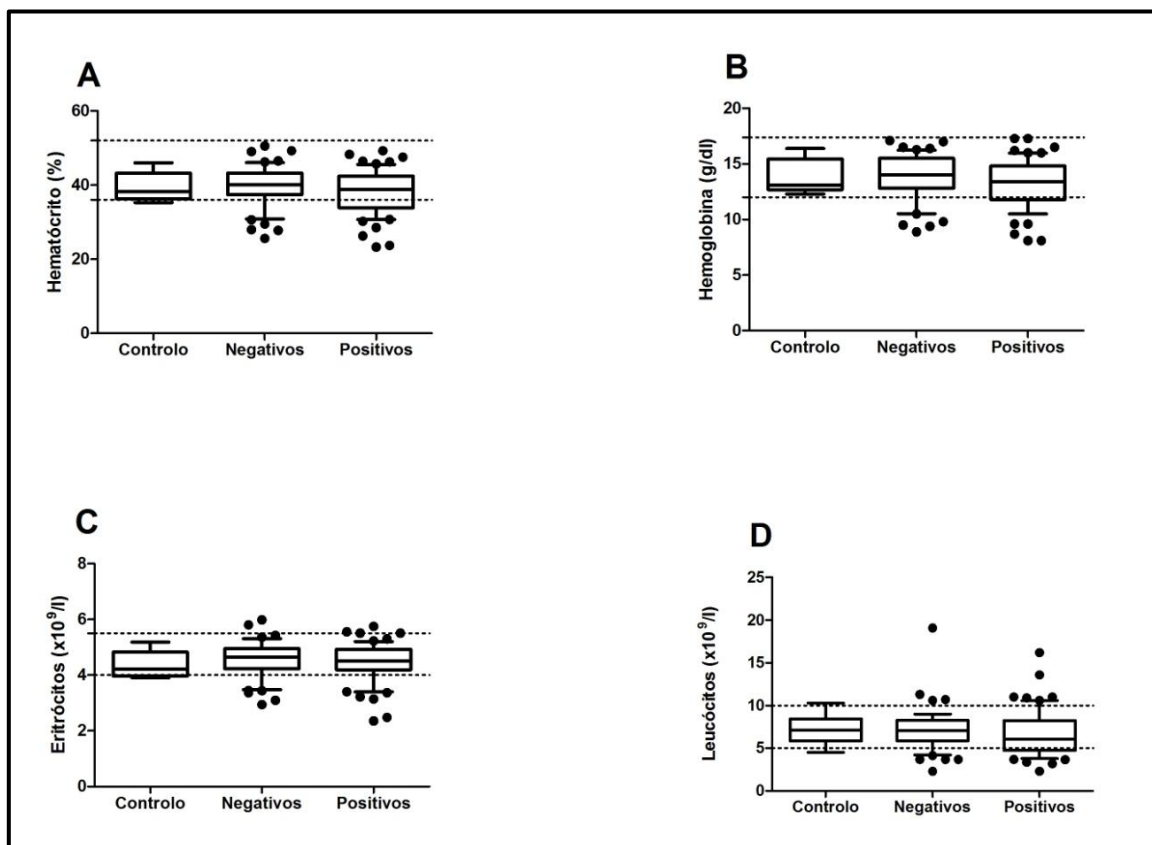
Na detecção de malária com analisadores hematológicos a análise CBC (do inglês *Complete Blood Count*), pode ser útil como uma ferramenta de diagnóstico adjuvante no trabalho de acompanhamento de pacientes febris (Campuzano-Zuluaga, *et al.*, 2010).

Ao analisar os resultados de alguns parâmetros do hemograma relativos ao eritrograma (eritrócitos, hematócrito e hemoglobina), verificou-se a ocorrência de anemia com especial ênfase no grupo com reatividade serológica positiva para anticorpos anti-*Plasmodium spp.* determinados por *ELISA* comercial (Figura 15). Os baixos valores também verificados em pacientes com reatividade serológica negativa podem dever-se a outras patologias, dado que não se tratam de parâmetros específicos para malária. Foram também analisados os resultados relativos aos leucócitos que se apresentaram elevados (leucocitose) em alguns dos pacientes positivos o que pode dever-se a uma resposta inflamatória (Figura 15 D). Porém existe nos pacientes com reatividade serológica uma tendência para a leucopénia como resultado da invasão do parasita nas células (Hänscheid, *et al.*, 2008).

Os valores de referência do hemograma tidos em conta para estes parâmetros foram os do aparelho de determinação *ABACUS JUNIOR* encontrando-se entre os seguintes intervalos: eritrócitos  $[4,00-5,50 \times 10^9/l]$ , hematócrito  $[36,00-52,00\%]$ , hemoglobina  $[12,0-17,4g/dl]$ , e leucócitos  $[5,00-10,00 \times 10^9/l]$ .

Foram obtidos resultados para o parâmetro do hematócrito para 9 dos 14 indivíduos do controlo negativo com uma mediana de 38,3%, mínima de 35,3% e máxima de 46,0%, percentil 25 de 36,3% e percentil 75 de 43,2%, média de 39,5 e desvio padrão (SD) 3,7. Dos 53 pacientes sem reatividade serológica (negativos) para *Plasmodium spp.* foram obtidos resultados de hematócrito para 51 pacientes com uma mediana de 40,1%, mínima de 25,6% e máxima de 50,6%, percentil 25 de 37,4% e percentil 75 de 43,2%, média de 39,6 e desvio padrão (SD) 5,5. Dos 65 pacientes com reatividade serológica (positivos) para *Plasmodium spp.* foram obtidos resultados de hematócrito para 62 pacientes com uma mediana de 38,9%, mínima de 2,3% e máxima de 49,3%, percentil 25 de 33,8% e percentil 75 de 42,4%, média de 38,0% e desvio padrão (SD) 5,8.

Relativamente ao parâmetro da hemoglobina foram obtidos resultados para 9 dos 14 indivíduos do controlo negativo com uma mediana de 13,1 g/dl mínima de 12,3 g/dl e máxima de 16,4 g/dl, percentil 25 de 12,7 g/dl e percentil 75 de 15,4 g/dl, média de 13,8 e desvio padrão (SD) 1,5. Dos 53 pacientes sem reatividade serológica para *Plasmodium spp.* foram obtidos resultados de hemoglobina para 52 pacientes com uma mediana de 14,0 g/dl, mínima de 8,9 g/dl e máxima de 17,1 g/dl, percentil 25 de 12,8 g/dl e percentil 75 de 15,5 g/dl, média de 13,8 e desvio padrão (SD) 2,0. Dos 65 pacientes com reatividade serológica para *Plasmodium spp.* foram obtidos resultados de hematócrito para 62 pacientes com uma mediana de 13,4 g/dl, mínima de 8,1 g/dl e máxima de 17,3 g/dl, percentil 25 de 11,8 g/dl e percentil 75 de 14,8 g/dl, média de 13,1 g/dl e desvio padrão (SD) 2,1.



**Figura 15:** Resultados de alguns parâmetros do hemograma realizado aos pacientes incluídos no estudo: **A.** Hematócrito, **B.** Hemoglobina, **C.** Eritrócitos, **D.** Leucócitos.

Não há nenhuma evidência clara que apoie os níveis de corte específicos de hemoglobina (Day & Dondorp, 2007). Contudo a Organização Mundial de Saúde define



como uma AMS uma hemoglobina com nível abaixo de 5,0 g/dL na presença de parasitas da malária (Obonyo, *et al.*, 2007) o que não se verificou neste ensaio.

Obteve-se resultados para 9 dos 14 indivíduos do controlo negativo para o parâmetro dos eritrócitos com uma mediana de 4,2 mínima de 2,3 x10<sup>9</sup>/l e máxima de 5,1 x10<sup>9</sup>/l, percentil 25 de 3,9x10<sup>9</sup>/l e percentil 75 de 4,8x10<sup>9</sup>/l, média de 4,3x10<sup>9</sup>/l e desvio padrão (SD) 0,4. Dos 53 pacientes sem reatividade serológica para *Plasmodium spp.* foram obtidos resultados para 51 pacientes com uma mediana de 4,6x10<sup>9</sup>/l, mínima de 2,9x10<sup>9</sup>/l e máxima de 5,9x10<sup>9</sup>/l, percentil 25 de 4,2x10<sup>9</sup>/l e percentil 75 de 4,9x10<sup>9</sup>/l, média de 4,5x10<sup>9</sup>/l e desvio padrão (SD) 0,6. Dos 65 pacientes com reatividade serológica para *Plasmodium spp.* foram obtidos resultados de quantidade de eritrócitos para 62 pacientes com uma mediana de 4,5x10<sup>9</sup>/l, mínima de 2,3x10<sup>9</sup>/l e máxima de 5,7x10<sup>9</sup>/l, percentil 25 de 4,1x10<sup>9</sup>/l e percentil 75 de 4,9x10<sup>9</sup>/l, média de 4,4x10<sup>9</sup>/l e desvio padrão (SD) 0,6.

Foram obtidos resultados de leucócitos para 9 dos 14 indivíduos do controlo negativo com uma mediana de 7,1 x10<sup>9</sup>/l, mínima de 4,5 x10<sup>9</sup>/l e máxima de 10,3 x10<sup>9</sup>/l, percentil 25 de 5,8 x10<sup>9</sup>/l e 75 de 8,4 x10<sup>9</sup>/l, média de 7,1 e desvio padrão (SD) 1,7. Dos 53 pacientes sem reatividade serológica para *Plasmodium spp.* foram obtidos resultados para 52 pacientes com uma mediana de 7,0 x10<sup>9</sup>/l, mínima de 2,3 x10<sup>9</sup>/l e máxima de 19,1 x10<sup>9</sup>/l, percentil 25 de 5,8 x10<sup>9</sup>/l e 75 de 8,2 x10<sup>9</sup>/l, média de 7,1 e desvio padrão (SD) 2,4. Dos 65 pacientes com reatividade serológica para *Plasmodium spp.* foram obtidos resultados para 61 pacientes com uma mediana de 6,0 x10<sup>9</sup>/l, mínima de 2,3 x10<sup>9</sup>/l e máxima de 16,2 x10<sup>9</sup>/l, percentil 25 de 4,7 x10<sup>9</sup>/l e percentil 75 de 8,2 x10<sup>9</sup>/l, média de 6,7 x10<sup>9</sup>/l e desvio padrão (SD) 2,7.

#### **4.4 Determinação de anticorpos totais anti-*Plasmodium spp.* em pacientes com quadro clínico suspeito de malária**

A infeção por malária leva à produção de anticorpos específicos que podem ser geralmente detetados poucos dias após o aparecimento de parasitas no sangue. A deteção de anticorpos é mais sensível do que a deteção direta do parasita, uma vez que é

independente das flutuações no nível de parasitémia num curto prazo, e mantém-se positivo no caso de parasitémia subpatente<sup>4</sup>. Há quatro indicações para a realização de investigação sorológica: (1) triagem de doadores de sangue que retornam de áreas endêmicas de malária; (2) pacientes que retornam dos trópicos com febre de origem desconhecida; (3) pacientes com suspeita de malária "grande baço" a doença; (4) estudos de campo epidemiológicos.

Através do kit comercial de *ELISA MALARIA EIA TEST KIT* (BioRad, EUA) determinou-se a reatividade serológica quanto à presença de anticorpos totais (IgG, IgM e IgA) anti-*Plasmodium spp* nas amostras de soro dos pacientes com clínica suspeita de malária. Estes resultados representam a presença de anticorpos totais do tipo IgG, IgM e IgA específicos para *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae*. O antígeno utilizado no *Kit* é um extrato total do cultivo *P. falciparum* enriquecido com antígenos recombinantes de *P. vivax*, permitindo a deteção de anticorpos contra *P. falciparum* e *P. vivax*. Devido à similaridade antigénica entre espécies de *Plasmodium*, *P. ovale* e *P. malariae* os anticorpos contra estes parasitas também podem ser detetados.

Foram analisados 118 soros de pacientes com quadro clínico suspeito de malária. Como controlo negativo utilizou-se um grupo de 14 soros de portugueses saudáveis que nunca estiveram em zonas endémicas.

A partir da análise dos resultados do *ELISA* comercial podemos discriminar a população serologicamente negativa e positiva para anticorpos anti-*Plasmodium spp.*, como se pode observar na figura 16.

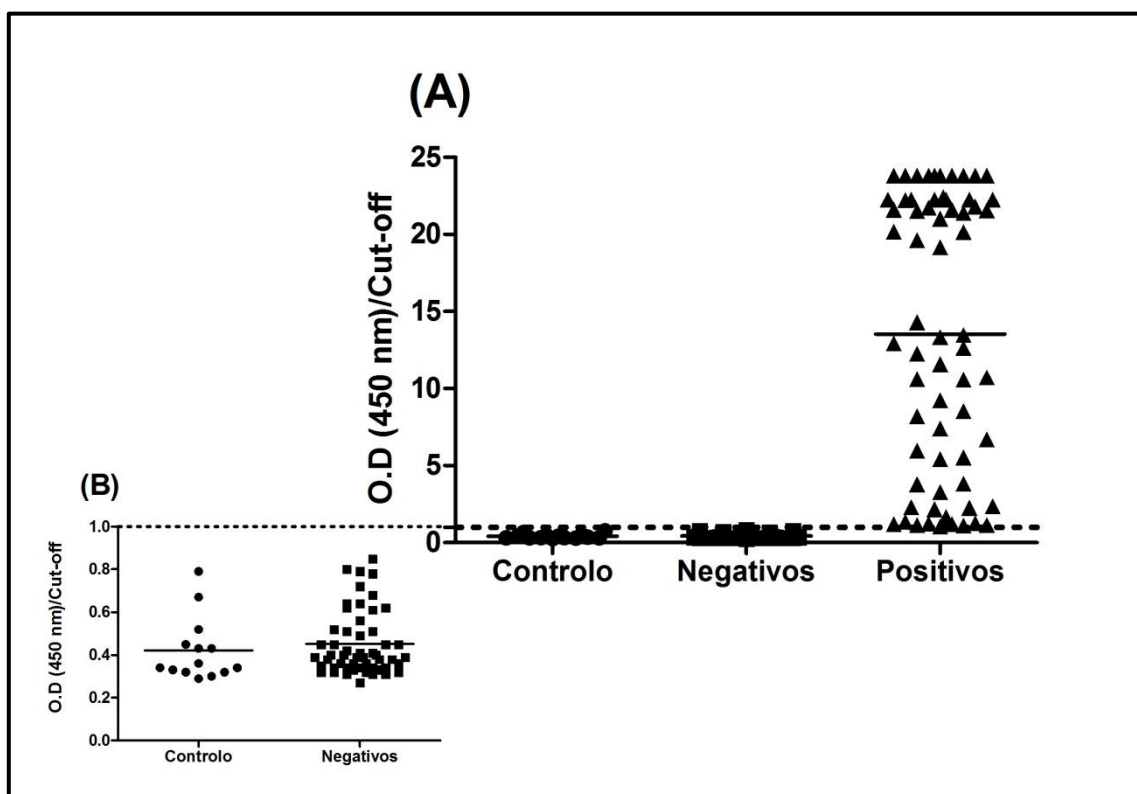
Dos 118 soros analisados, 65 apresentam anticorpos anti-*Plasmodium spp.*, acima do *cut-off* o que corresponde à população serologicamente positiva, e 53 dos soros analisados apresentam-se abaixo do *cut-off*, correspondendo à população serologicamente negativa que não têm presente anticorpos específicos anti-*Plasmodium*.

---

<sup>4</sup> **Subpatente** é o período que, em muitas protozoonoses, se segue ao período do patente, de duração indefinida, no qual não se pode evidenciar a presença de protozoários pelos métodos correntes de observação.

A partir desta discriminação prosseguiu-se para a pesquisa de anticorpos totais IgG e IgM anti-*P. falciparum*.

Uma das limitações do *kit* comercial de *ELISA* é ter apenas adsorvido à placa alguns antígenos recombinantes e não as proteínas nativas e totais de *Plasmodium spp*, o que limita a detecção de possíveis anticorpos reativos a outros antígenos de fase-específica durante a infecção.



**Figura 16:** Níveis séricos de anticorpos anti-*Plasmodium spp*. em soros de pacientes com clínica suspeita de malária. **(A):** Gráfico representativo da O.D (450nm)/Cut-off do grupo controle (n=14), dos soros sem reatividade serológica (n=53) e dos soros com reatividade serológica (n=65). **(B):** Gráfico representativo da O.D (450nm)/Cut-off do grupo controle (n=14) e dos soros sem reatividade serológica (n=53). n=número de indivíduos.

#### 4.5 Determinação de anticorpos do tipo IgM e IgG específicos para *Plasmodium falciparum*

A medição de anticorpos antimaláricos por *ELISA* demonstrou ser uma ferramenta epidemiológica potencialmente útil (Corran, *et al.*, 2007), contudo a deteção específica de anticorpos não permite distinguir infeções passadas de infeções presentes (Balthazar-Guedes, *et al.*, 1995).

Neste estudo, validou-se e otimizou-se um *ELISA* anti-*P. falciparum* para distinguir os soros mais imunoreativos relativamente à presença de anticorpos específicos do tipo IgG e IgM anti-*P. falciparum*.

Para tal recorreu-se ao *ELISA* anti-*P. falciparum* que tem adsorvido à placa o extrato total de proteínas de *P. falciparum* sendo específico apenas para *P. falciparum* enquanto que o *ELISA* comercial tem adsorvido à placa apenas 4 antigénios recombinantes de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae*.

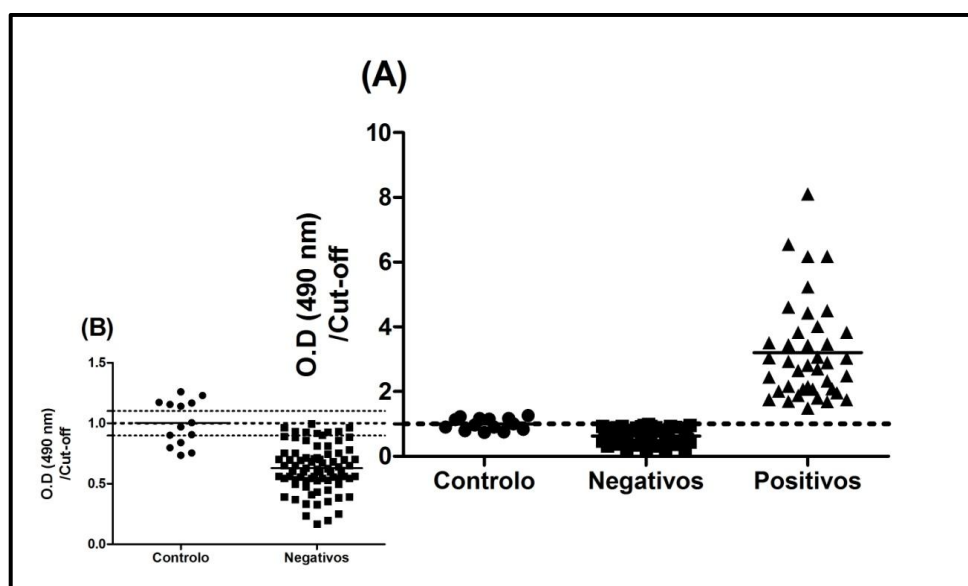
Para otimizar e validar o método *ELISA* anti-*P. falciparum* utilizou-se 118 soros previamente analisados para a presença de anticorpos totais anti-*Plasmodium spp.* Como controlo negativo, utilizou-se 14 soros de indivíduos saudáveis de Portugal que nunca estiveram em zonas endémicas de malária.

Todos os soros com clínica suspeita de malária foram analisados pesquisando-se anticorpos totais anti-*P.falciparum* (IgA, IgG e IgM), anticorpos anti-*P.falciparum* IgG e anticorpos anti-*P.falciparum* IgM numa diluição de 1:100.

Para diferenciar os soros com reatividade serológica dos soros sem reatividade serológica, definiu-se um ponto limite (*cut-off*) que permite distinguir esses dois grupos de soros. Para determinar o valor do *cut-off* utilizaram-se os soros do grupo controlo de 14 indivíduos saudáveis de Portugal que nunca estiveram em zonas endémicas de malária.

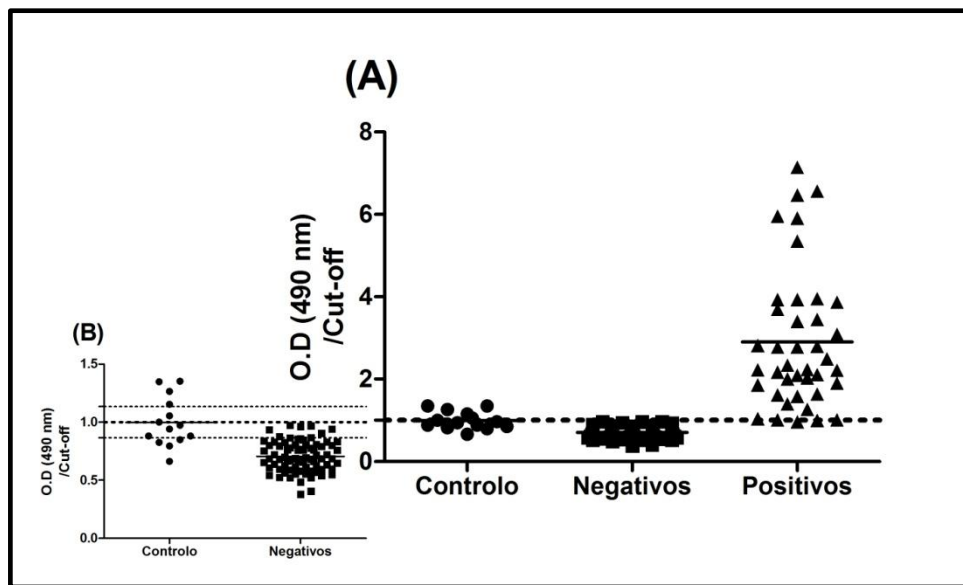
O valor de *cut-off* é dado pela soma da média dos valores de absorvância dos soros negativos com o desvio padrão (SD) a uma determinada diluição. O peso que o desvio padrão pode ter no valor de *cut-off* depende da sensibilidade e da especificidade que esse valor de *cut-off* vai conferir ao método. Neste estudo, para a diluição de 1:100, o *cut-off* foi definido como sendo a soma da média dos valores de absorvância dos soros do grupo controlo com o dobro do desvio padrão ( $Cut-off = média + 1SD$ ). Foi escolhida a ponderação de (1SD), porque com este valor de *cut-off* todos os soros sem reatividade serológica têm um valor de absorvância menor ou igual ao valor de *cut-off* para a diluição escolhida.

Na análise de resultados são considerados soros com reatividade serológica para anticorpos totais anti-*P.falciparum* todos os soros cuja razão entre o valor de absorvância/*cut-off* for superior a 1,1.



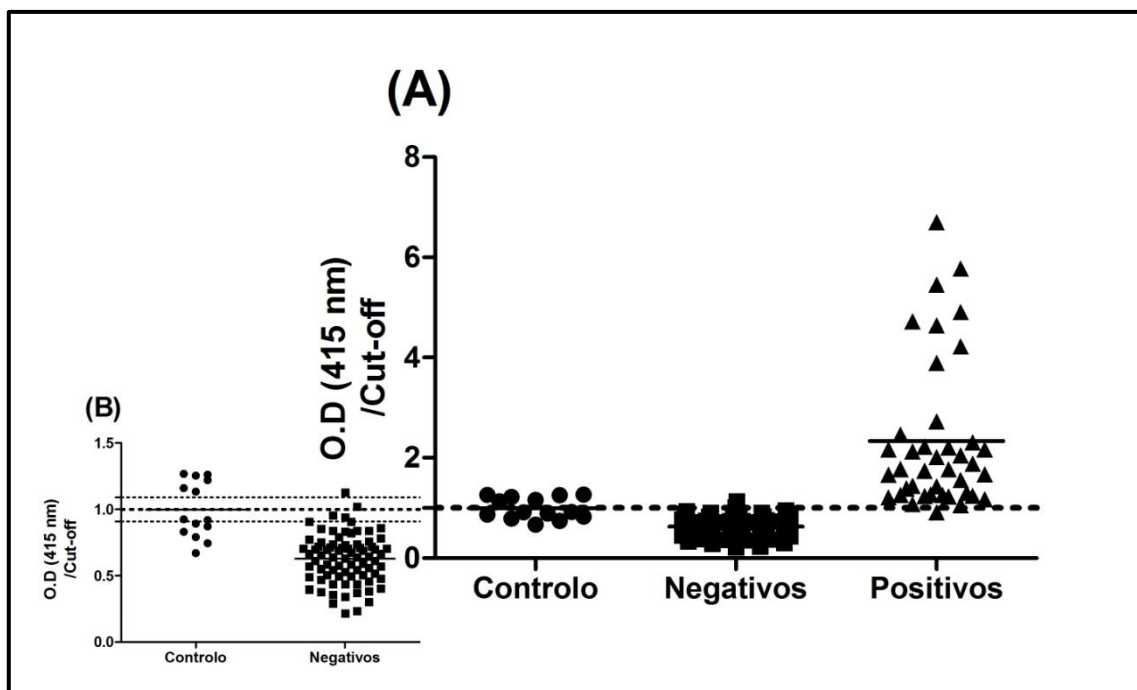
**Figura 17:** Níveis séricos de anticorpos totais (IgA, IgG e IgM) anti-*P. falciparum* em soros de pacientes com clínica suspeita de malária num total de 132 soros. (A): Gráfico representativo da O.D (490nm)/*Cut-off* do grupo controlo (n=14), dos soros sem reatividade serológica (n=78) e dos soros com reatividade serológica (n=40). (B): Gráfico representativo da O.D (490nm)/*Cut-off* do grupo controlo (n=14) e dos soros sem reatividade serológica (n=78). n=número de indivíduos.

A análise dos resultados da pesquisa das imunoglobulinas IgA, IgG e IgM anti-*P. falciparum* pelo método *ELISA* indireto indica 40 soros com reatividade serológica e 78 soros sem reatividade serológica (Figura 17). Foram detetados 37 soros com reatividade serológica para anticorpos anti-*P. falciparum* do tipo IgG e 78 soros sem reatividade serológica (Figura 18). Os restantes 3 soros, apesar de se encontrarem acima do *cut-off*, foram considerados como indeterminados por se encontrarem abaixo da razão entre o valor de absorvância/*cut-off* de 1,1.



**Figura 18.** Níveis séricos de anticorpos anti-*P.falciparum* do tipo IgG em soros de pacientes com suspeita clínica de malária num total de 132 soros. **(A):** Gráfico representativo da O.D (490nm)/*Cut-off* dos soros do grupo controlo (n=14), dos soros sem reatividade serológica (n=78), soros com reatividade serológica (n=37) e indeterminados (n=3). **(B):** Gráfico representativo da O.D (490nm)/*Cut-off* do grupo controlo (n=14) e dos soros sem reatividade serológica (n=78). n=número de indivíduos.

No presente estudo também se pesquisaram anticorpos anti-*P.falciparum* do tipo IgM, tendo em conta que a resposta por parte deste tipo de anticorpos está associada com uma infecção recente ou presente e os soros serem de pacientes de fase aguda, estando portanto numa fase inicial da infecção. Na análise de resultados da pesquisa de IgM anti-*P.falciparum* foram igualmente detetados 37 soros com reatividade serológica e 78 soros sem reatividade tendo sido considerados como indeterminados 3 soros (Figura 19).



**Figura 19** Níveis séricos de anticorpos anti-*P.falciparum* do tipo IgM em soros de pacientes com suspeita clínica de malária num total de 132 soros. **(A)**: Gráfico representativo da O.D (490nm)/Cut-off dos soros do grupo controlo (n=14), dos soros sem reatividade serológica (n=78), soros com reatividade serológica (n=37) e indeterminados (n=3). **(B)**: Gráfico representativo da O.D (490nm)/Cut-off do grupo controlo (n=14) e dos soros sem reatividade serológica (n=78). n=número de indivíduos.

O ensaio imunoenzimático para deteção de anticorpos anti-*P.falciparum* validado e otimizado para este estudo mostrou-se eficaz uma vez que os resultados, comparados com o ensaio imunoenzimático para deteção de anticorpos totais anti-*Plasmodium spp.*, são na sua maioria concordantes (Tabela 9).

Cerca de 21% dos soros que apresentaram reatividade serológica para anticorpos totais anti-*Plasmodium spp.* revelaram-se serologicamente negativos para anticorpos anti-*P.falciparum* (Tabela 9). Tal deve-se ao facto do *ELISA* comercial detetar a presença de anticorpos específicos para outras espécies de *Plasmodium spp.*

**Tabela 9:** Comparação do *ELISA* comercial para anticorpos totais de *Plasmodium spp.* e *ELISA* anti-*P. falciparum*.

<i>ELISA</i> comercial		<i>ELISA</i> anti- <i>P.falciparum</i>	
Positivos	Negativos	Positivos	Negativos
65	53	40	78

Determinou-se o valor da especificidade e sensibilidade para o *ELISA* anti-*P. falciparum*, por comparação com o *ELISA* comercial, recorrendo à fórmula 1 e 2, respetivamente (Lalkhen & McCluskey, 2008). O valor de especificidade encontrado foi de 68% e de sensibilidade foi de 61%.

Fórmulas:

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{Positivos corretos}}{\text{Positivos corretos} + \text{Falsos negativos}}$$

$$\text{Especificidade} = \frac{\text{Negativos corretos}}{\text{Negativos corretos} + \text{Falsos positivos}}$$

A sensibilidade é definida pelo número de falsos negativos, ou seja, soros positivos pelo *ELISA* comercial e negativos pelo *ELISA* anti-*P. falciparum*. Por isso, este valor de sensibilidade está a ser subvalorizado pela presença de antígenos relativos a outras espécies de *Plasmodium spp* utilizados no *ELISA* comercial.

A especificidade é definida pelo número de falsos positivos, ou seja, soros negativos pelo *ELISA* comercial e positivos pelo *ELISA* anti-*P. falciparum*. Este valor também está a ser subvalorizado pelo facto do *ELISA* anti-*P. falciparum* utilizar o extrato total, o que aumenta a probabilidade de haver soros que são positivos pelo *ELISA* anti-*P. falciparum* e negativos pelo *ELISA* comercial.



#### 4.6 Determinação de subtipos de anticorpos anti-*Plasmodium falciparum*

Pensa-se que os anticorpos do tipo IgG anti-*P. falciparum* têm um papel crítico na proteção imunitária contra a forma assexuada nos estádios sanguíneos do parasita. Altos níveis das subclasses IgG1 e IgG3 citofílicos têm sido associados com uma baixa parasitémia e conferem proteção contra a forma de malária grave. Em contraste, os níveis elevados de anticorpos IgG4 não-citofílicos foram associados com a suscetibilidade à malária (Afridi, *et al.*, 2012).

Neste estudo, validou-se e otimizou-se um imunoensaio anti-*P. falciparum* para distinguir os soros mais reativos relativamente à presença dos subtipos de anticorpos IgG1, IgG3 e IgG4 anti-*P. falciparum*.

Para tal recorreu-se ao *ELISA* anti-*P. falciparum* que tem adsorvido à placa o extrato total de proteínas de *P. falciparum* sendo específico apenas para *P. falciparum*.

Para otimizar e validar o imunoensaio para deteção de anticorpos anti-*P. falciparum* do tipo IgG1, IgG3 e IgG4 utilizou-se 40 soros previamente analisados pelo imunoensaio comercial para deteção de anticorpos anti-*Plasmodium spp.* e pelo imunoensaio anti-*P. falciparum* para deteção dos anticorpos IgG e IgM e que foram considerados ambos serologicamente reativos. Como controlo negativo, utilizaram-se 14 soros de indivíduos saudáveis de Portugal que nunca estiveram em zonas endémicas de malária.

Todos os 40 soros com reatividade serológica para anticorpos anti-*Plasmodium spp.* e anticorpos totais anti-*P. falciparum* foram analisados, na pesquisa de anticorpos do tipo IgG1, IgG3 e IgG4 numa diluição de 1:50 (Tabela 10).

Para diferenciar os soros com e sem reatividade serológica, definiu-se um ponto limite (*cut-off*) que permite distinguir esses dois grupos de soros. Para determinar o valor do *cut-off* utilizou-se o grupo controlo de 14 indivíduos saudáveis de Portugal que nunca estiveram em zonas endémicas de malária.

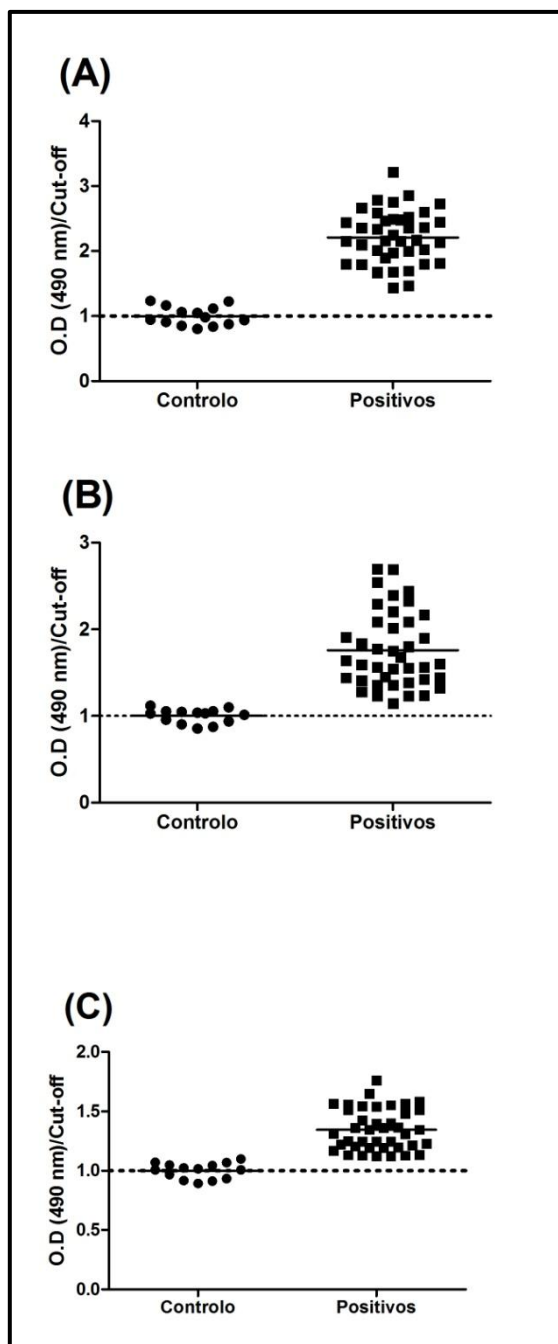
O valor de *cut-off* é dado pela soma da média dos valores de absorvância dos soros negativos com o desvio padrão (SD) a uma determinada diluição. Neste estudo, para a diluição de 1:50, o *cut-off* foi definido como sendo a soma da média dos valores de absorvância dos soros do grupo controlo com o dobro do desvio padrão ( $Cut-off = média + 1SD$ ). Foi escolhida a ponderação de (1SD), porque com este valor de *cut-off* todos os soros negativos têm um valor de absorvância menor ou igual ao valor de *cut-off* para a diluição escolhida.

Na análise de resultados são considerados serologicamente reativos todos os soros cujo valor da razão entre o valor de absorvância/*cut-off* for superior a 1,1.

A análise dos resultados da pesquisa da imunoglobulina IgG1 anti-*P. falciparum* pelo método *ELISA* indireto indica todos os 40 soros com reatividade serológica (Figura 20 A). Dos soros com reatividade para IgG1 o seu valor de mediana encontra-se nos 2,163 (OD), valor mínimo de 1,436, percentil 25 de 1,834, valor máximo de 3,211, percentil 75 de 2,490, média de 2,207 e SD de 0,41.

Na pesquisa de IgG3 anti-*P. falciparum* foram detetados 40 soros com reatividade serológica (Figura 20 B). Destes mesmos soros com reatividade para IgG3 o seu valor de mediana encontra-se nos 1,623 (OD), valor mínimo de 1,145, percentil 25 de 1,412, valor máximo de 2,694, percentil 75 de 2,087, média de 1,759 e SD de 0,43.

Foram também detetados 40 soros com reatividade serológica a anticorpos anti- *P. falciparum* do tipo IgG4 (Figura 20 C). O valor de mediana para IgG4 encontra-se nos 1,330 (OD), valor mínimo de 1,124, percentil 25 de 1,2, valor máximo de 1,761, percentil 75 de 1,511, média de 1,346 e SD de 0,17.



**Figura 20:** Níveis séricos dos anticorpos anti-*P.falciparum* do tipo IgG1, IgG3 e IgG4 em soros de pacientes com reatividade serológica para anticorpos anti-*Plasmodium spp.* e anticorpos anti-*P.falciparum*. **(A):** Anticorpos específicos do tipo IgG1 num total de 54 soros. Grupo controlo (n=14) e com reatividade serológica (n=40); **(B):** Anticorpos específicos do tipo IgG3 num total de 54 soros. Grupo controlo (n=14) e com reatividade serológica (n=40); **(C):** Anticorpos específicos do tipo IgG4 num total de 54 soros. Grupo controlo (n=14) e com reatividade serológica (n=40). n=número de indivíduos.

**Tabela 10:** Mecanismo de imunidade referente aos soros de pacientes com malária.

Paciente (ID)	ELISA comercial	ELISA anti- <i>P. falciparum</i> (Ig A+G+M)	ELISA anti- <i>P. falciparum</i> (IgM)	ELISA anti- <i>P. falciparum</i> (IgG)	IgG1 (DO/Cut-off)	IgG3 (DO/Cut-off)	IgG4 (DO/Cut-off)
P54	+	+	+	+	1,678	1,566	1,346
P55	+	+	+	+	2,365	1,442	1,558
P56	+	+	+	+	2,441	2,694	1,129
P57	+	+	+	+	2,097	1,543	1,132
P58	+	+	+	+	1,803	2,017	1,214
P61	+	+	+	+	1,813	1,590	1,250
P62	+	+	+	+	2,725	1,231	1,580
P63	+	+	+	+	2,784	1,384	1,124
P64	+	+	+	+	2,481	1,751	1,192
P65	+	+	+	+	2,157	1,422	1,228
P67	+	+	+	+	1,678	1,801	1,566
P68	+	+	+	+	2,356	1,910	1,544
P70	+	+	+	+	2,358	1,679	1,541
P74	+	+	+	+	2,168	2,442	1,245
P76	+	+	+	+	1,898	1,604	1,363
P77	+	+	+	+	2,445	1,838	1,135
P78	+	+	+	+	2,467	1,899	1,170
P79	+	+	+	+	2,156	1,145	1,220
P80	+	+	+	+	2,590	1,280	1,365
P82	+	+	+	+	2,663	2,205	1,481
P84	+	+	+	+	2,493	2,292	1,761
P85	+	+	+	+	3,211	1,642	1,247
P86	+	+	+	+	2,249	1,775	1,648
P88	+	+	+	+	2,024	2,393	1,566
P89	+	+	+	+	2,336	1,353	1,511
P90	+	+	+/-	+	1,799	2,087	1,129
P92	+	+	+/-	+	2,012	1,408	1,426
P94	+	+	+	+/-	1,465	1,231	1,245
P95	+	+	+	+	1,661	1,234	1,192
P97	+	+	+	+	2,524	1,353	1,401
P98	+	+	+/-	+/-	2,856	1,445	1,124
P100	+	+	+	+	2,152	1,564	1,363
P101	+	+	+	+/-	2,600	2,688	1,313
P104	+	+	+	+	2,753	1,324	1,310
P106	+	+	+	+/-	1,796	2,168	1,198
P108	+	+	+	+	2,131	2,543	1,206
P109	+	+	+	+	1,696	2,087	1,396
P111	+	+	+	+	1,974	1,555	1,552
P117	+	+	+	+	1,436	2,324	1,511
P118	+	+	+	+	2,003	1,451	1,346

+/- Valor superior ao *cut-off* mas inferior a 1,1.

Das três imunoglobulinas estudadas, a que apresentou uma média de valores de absorvância mais elevados foi a imunoglobulina IgG1, seguida da imunoglobulina do tipo IgG3 e da IgG4 que apresentou os valores mais baixos logo, neste estudo, os seus valores médios apresentam-se da seguinte forma:  $IgG4 < IgG3 < IgG1$ .

Contrariamente ao trabalho publicado até agora, respostas com valores elevados de anticorpos anti-*P.falciparum* do tipo IgG1 e IgG3 foram detetadas em pacientes com serologia positiva para malária, em vez de se encontrar presente em indivíduos saudáveis o que, no entanto, vai de encontro aos resultados descritos por (Schreiber, *et al.*, 2006). Níveis elevados de IgG1 e IgG3 são também encontrados em casos de malária não severa (Leoratti, *et al.*, 2008). Devido à sua presença em pacientes doentes, estes anticorpos não são, portanto, suscetíveis de ser associados com funções de proteção. Estas respostas são, provavelmente, induzidas como resultado episódios recentes de malária (Schreiber, *et al.*, 2006) (Tabela 10).

#### 4.7 Determinação das proteínas solúveis C5a e CRP

Existem várias evidências que indicam que os antígenos da malária, ou em eritrócitos infetados, ou sob antígenos livres em circulação oriundos da rutura de esquizontes, ou complexos imunes formados a partir de anticorpos que têm como alvo os antígenos, podem ativar o sistema complemento (Nyakoe, *et al.*, 2009).

O sistema de complemento é um componente essencial da resposta imune inata para um grande número de agentes infecciosos. A cascata do complemento pode ser ativada por quatro vias distintas, três das quais convergem para o nível do componente C3, levando para a clivagem de C3 e C5 nas suas formas ativadas, C3a e C5a, assim como á formação do terminal complexo de ataque á membrana (Conroy, *et al.*, 2009).

O C5a é um dos mais potentes péptidos inflamatórios, com um largo espectro de funções. Trata-se de um potente componente quimiotático (apresentando atividade biológica em concentrações de 1-10 nM no soro) para os neutrófilos e também tem atividade quimiotática para monócitos e macrófagos. O C5a causa um elevado consumo

oxidativo nos neutrófilos e aumenta a fagocitose e liberação de enzimas granulares. Tem sido demonstrado que o C5a está envolvido na modulação da expressão de citocinas a partir de vários tipos de células, para provocar a apoptose de neutrófilos, para aumentar a expressão da molécula de adesão de neutrófilos, e para ativar a via de coagulação. O C5a exerce seus efeitos através dos recetores de alta afinidade de C5a (C5aR e C5L2) (Guo & Ward, 2005).

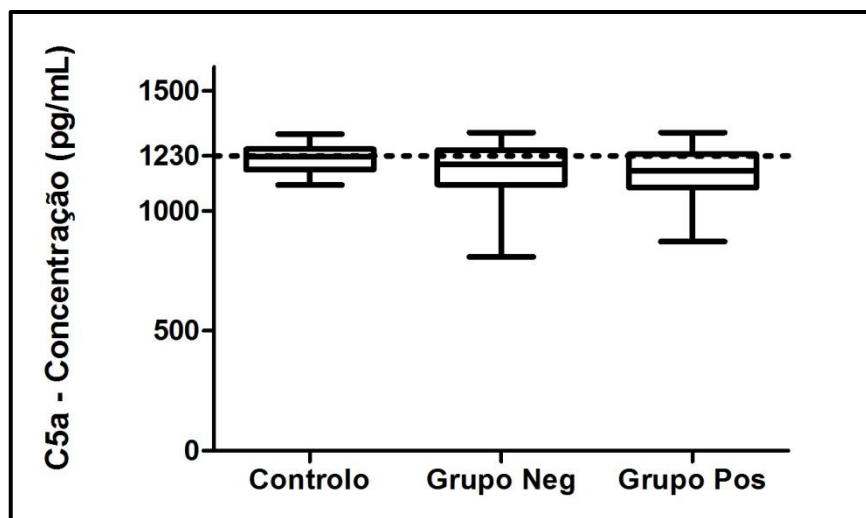
Na determinação da concentração da proteína do complemento C5a os soros foram previamente separados em dois grupos: o grupo dos soros com reatividade serológica para anticorpos anti-*Plasmodium spp.* e anti-*P.falciparum* (grupo positivos, n=40) e o grupo dos soros sem reatividade serológica para anti-*Plasmodium* (grupo negativos, n=78). Para o grupo controlo utilizaram-se 14 soros de indivíduos saudáveis de Portugal que nunca estiveram em zonas endémicas de malária.

Do total de amostras analisadas no grupo de soros sem reatividade serológica para anticorpos anti-*P.falciparum* (n=78), 47 soros encontram-se abaixo do valor de *cut-off* (média das concentrações do grupo controlo) e 31 encontram-se acima do valor de *cut-off*. Este grupo de soros (soros negativos) apresentou uma mediana de 1194 pg/mL, média de 1178 pg/mL um valor mínimo de 809 pg/mL, máximo de 1327 pg/mL, percentil 25 de 1111 pg/mL e percentil 75 de 1254 pg/mL (Figura 21).

Do total de amostras analisadas no grupo de soros com reatividade serológica para anticorpos anti-*P.falciparum* (n=40), 24 soros encontram-se abaixo do valor de *cut-off* e 16 soros encontram-se acima do valor de *cut-off*. Este grupo de soros (soros positivos) apresentou uma mediana de 1169 pg/mL, média de 1162 pg/mL um valor mínimo de 873 pg/mL, máximo de 1327 pg/mL, percentil 25 de 1099 pg/mL e percentil 75 de 1237 pg/mL (Figura 21).

Esta resposta do sistema complemento, com elevação do C5a em 16 das 40 amostras para soros com reatividade serológica para *P.falciparum*, vai de encontro ao que está descrito na literatura (Nyakoe, *et al.*, 2009; Lackner, *et al.*, 2008; Botto, *et al.*, 2009) e que reforça a ideia da sua importância na resposta à malária. Sabe-se que C5a joga um

papel importante na cascata do complemento, sendo importante no controlo das infeções. No entanto, níveis excessivos deste componente poderão ser prejudiciais, necessitando de um estreito equilíbrio dos seus níveis (Lackner, *et al.*, 2008; Patel, *et al.*, 2008).



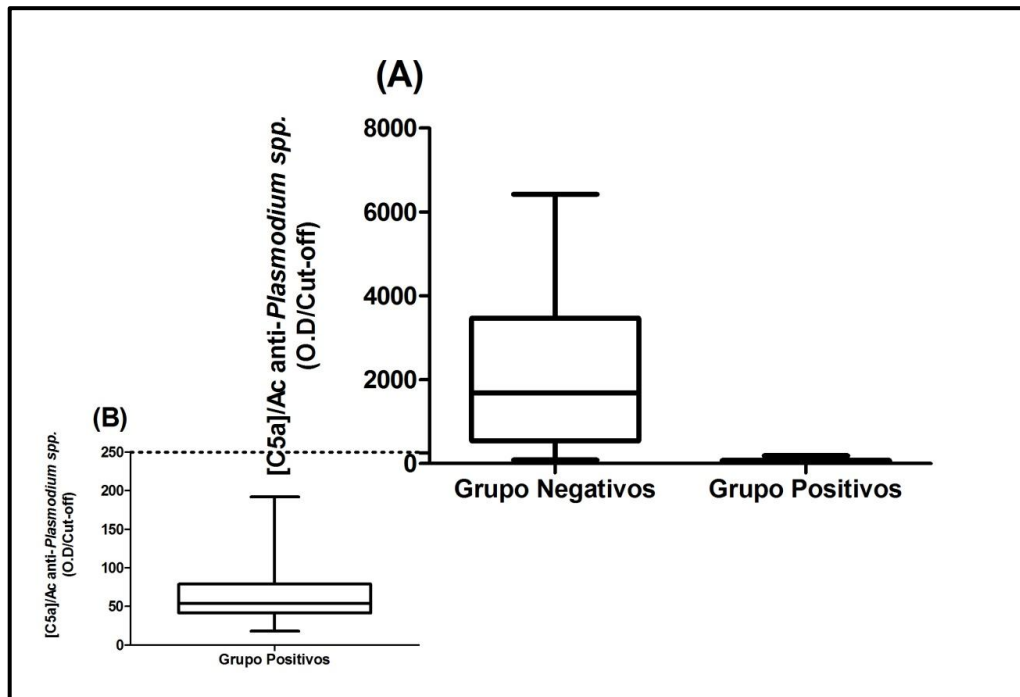
**Figura 21:** Níveis séricos de C5a em soros de pacientes com suspeita clínica de malária. Pesquisou-se o componente C5a do sistema complemento num total de 132 soros. Grupo controlo (n=14), grupo sem reatividade serológica para anticorpos anti-*P.falciparum* (grupo negativos, n=78) e grupo com reatividade serológica para anticorpos anti-*P.falciparum* (grupo positivos, n=40). n=número de indivíduos.

Para testar a distribuição dos dois grupos (soros positivos e negativos para anticorpos anti-*P.falciparum*) foi aplicado o teste não paramétrico teste U de Mann-Whitney, aplicado para duas amostras independentes. O teste de Mann-Whitney foi usado para testar a heterogeneidade de duas amostras ordinais. A abordagem inicial é a seguinte:

1. As observações a partir de ambos os grupos são independentes;
2. As observações são variáveis ordinais ou contínuas;
3. Sob a hipótese nula, a distribuição a partir de ambos os grupos é a mesma;
4. Sob a hipótese alternativa, os valores das amostras tendem a exceder os dos outros:  $P(X > Y) + 0.05 P(X = Y) > 0.05$

Segundo o teste de Mann-Whitney, não existem diferenças estatisticamente significativas na distribuição de ambos os grupos dado que  $P=0.2688 (>0,05)$ .

As subclasses IgG3 e IgG1 também ativam a via clássica do complemento (Arosa, *et al.*, 2007). Dados os níveis elevados de IgG1 e IgG3 no grupo de soros com reatividade serológica para anti-*P.falciparum*, e uma vez que este tipo de imunoglobulinas (IgG1 e IgG3) pode iniciar a destruição de agentes patogénicos por ativar o sistema complemento pode justificar o nível elevado desta proteína do complemento (C5a).



**Figura 22:** (A): Razão entre a concentração de C5a e anticorpos anti-*Plasmodium* spp. nos grupos sem reatividade serológica (n=78) e com reatividade serológica (n=40) para *P.falciparum*; (B): Devido ao contraste de resultados foi ampliado o gráfico com a razão entre os valores 0 e 250. n=número de indivíduos.

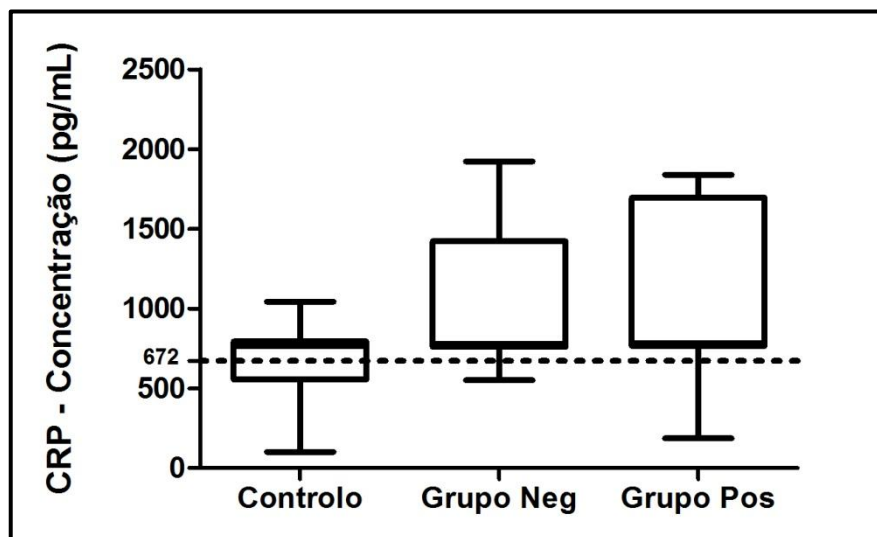
Serão necessários mais trabalhos para ajudar na compreensão do papel do sistema complemento na malária.

A proteína C reativa (CRP) é a principal proteína da fase aguda em humanos. Os níveis desta proteína quando conservada são baixos (0,1-0,5 mg/ml) mas aumentam para cerca do dobro (acima de 1000 mg/ml) durante a inflamação ou lesão tecidual (Pepys, 1981).



Sendo um componente importante do sistema imune inato, a CRP é capaz de reconhecer as células danificadas do hospedeiro para ajudar na sua eliminação. Ela pode ativar a via do complemento como por opsonização através da ligação com o seu ligante conduzindo á fagocitose independente do complemento (Ansar, *et al.*, 2006).

Do total de amostras analisadas no grupo de soros sem reatividade serológica para anticorpos anti-*P.falciparum* (n=78), 5 encontram-se abaixo do valor de *cut-off* e 73 encontram-se acima do valor de *cut-off*. Este grupo de soros (soros negativos) apresentou uma mediana de 779 pg/mL, média de 1020 pg/mL um valor mínimo de 550 pg/mL, máximo de 1921 pg/mL, percentil 25 de 759 pg/mL e percentil 75 de 1422 pg/mL.



**Figura 23:** Níveis séricos de CRP em amostras de soros de pacientes com clínica suspeita de malária. Pesquisou-se o componente CRP num total de 132 soros. Grupo controlo (n=14), grupo sem reatividade serológica para anticorpos anti-*P.falciparum* (grupo negativos, n=78) e grupo com reatividade serológica para anticorpos anti-*P.falciparum* (grupo positivos, n=40). n=número de indivíduos.

Do total de amostras analisadas no grupo de soros com reatividade serológica para anticorpos anti-*P.falciparum* (n=40), 6 encontram-se abaixo do valor de *cut-off* e 34 encontram-se acima do valor de *cut-off*. Este grupo de soros (soros positivos) apresentou uma mediana de 782 pg/mL, média de 1009 pg/mL um valor mínimo de 186

pg/mL, máximo de 1839 pg/mL, percentil 25 de 765 pg/mL e percentil 75 de 1696 pg/mL (Figura 23).

Uma experiência com o complemento demonstrou, em comparação com eritrócitos normais, a lise de eritrócitos parasitados quando se ligam especificamente á CRP após ativação da cascata do complemento (Ansar, *et al.*, 2006). Esta lise de eritrócitos parasitados pode causar anemia, que é um dado clínico muito comum na malária e vai de encontro aos dados hematológicos obtidos e aos níveis serológicos elevados para CRP para o grupo com reatividade para anticorpos anti-*P.falciparum*.

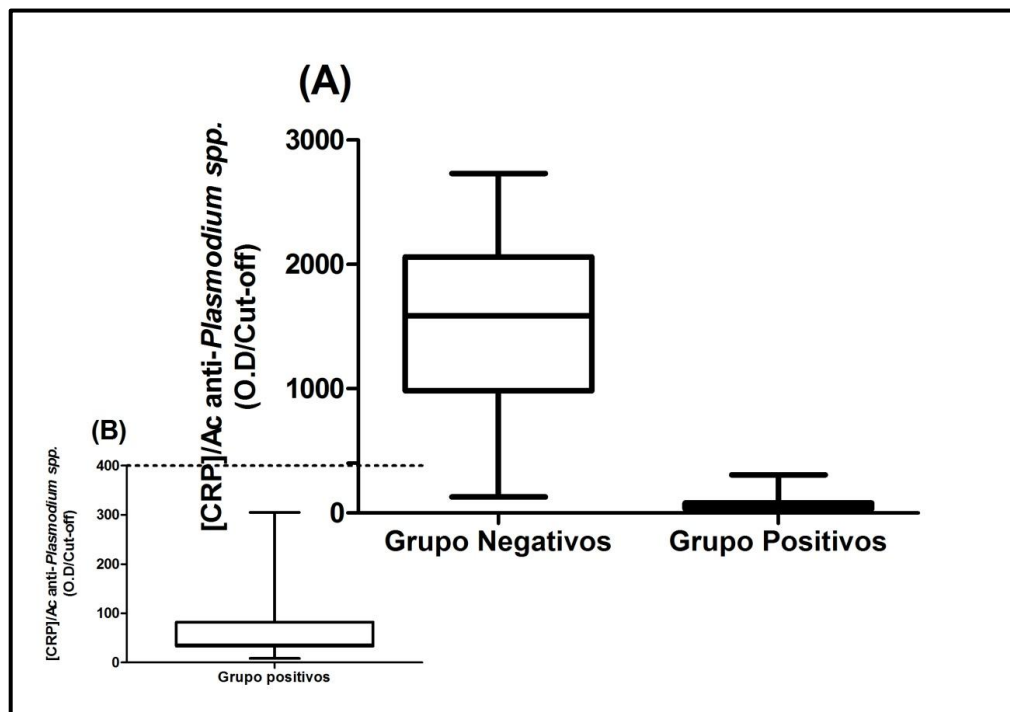
Segundo o teste de Mann-Whitney, não existem diferenças estatisticamente significativas na distribuição de ambos os grupos dado que  $P=0.6781$  ( $>0,05$ ).

A CRP é capaz de se ligar a uma larga gama de ligandos, incluindo certos fosfolipídios de membrana, poliacetatos, cromatina e a vários substratos biológicos que ocorrem naturalmente. A ligação de CRP a neutrófilos e monócitos também se encontra bem documentada. Esta inespecificidade de ligação do CRP pode explicar os elevados níveis de CRP tanto para o grupo positivo como para o grupo negativo.

Como forma de garantia do diagnóstico laboratorial e de confirmar a reatividade serológica determinada através do *ELISA* comercial para anticorpos anti-*Plasmodium spp.*, e dada a falta de informação em algumas fichas clínicas de pacientes, comparou-se a proteína do complemento inespecífica de malária (C5a) e a proteína C reativa (CRP) com anticorpos específicos anti-*Plasmodium spp.* (ver Anexos II e II). Verificou-se que quanto maior é o denominador (razão entre O.D/*Cut-off* do imunoensaio comercial), menor é a razão entre a concentração de C5a e CRP e anticorpos anti-*Plasmodium spp.* o que se verifica distintamente no grupo de pacientes serologicamente positivos para anticorpos anti-*P.falciparum* (Figuras 22 e 24).

Pretende-se também desta forma procurar marcadores de imunidade para a compreensão do estabelecimento da resposta imunitária durante a malária. Pode dizer-se então que

existe uma relação entre a citocina e os anticorpos: o grupo positivo diminui os seus valores e o grupo negativo aumenta.



**Figura 24:** (A): Razão entre a concentração de CRP e anticorpos anti-*Plasmodium* spp. nos grupos serologicamente negativos (n=78) e serologicamente positivos (n=40) para *P.falciparum*; (B): Devido ao contraste de resultados foi ampliado o gráfico com a razão entre os valores 0 e 400. n=número de indivíduos.

#### 4.8 Determinação citocina pro-inflamatória IFN- $\gamma$

O interferão- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) é uma importante citocina pró-inflamatória e um mediador de respostas imunes contra bactérias intracelulares e vírus. Além disso, desempenha um papel protetor contra a infecção por parasitas protozoários (Murray, *et al.*, 1983). O IFN- $\gamma$  é produzido principalmente por linfócitos, tais como células  $T\alpha\beta$ , células *natural killer* (NK), células T e  $T\gamma\delta$ . Algumas células mielóides também foram relatadas como tendo o potencial para a produção de IFN- $\gamma$  (Artavanis-Tsakonas & Riley, 2002). O interferão aumenta a atividade fagocitária, resultando na eliminação de bactérias extracelulares e parasitas protozoários, e a sua produção por células T *helper*  $CD4^+$ , células T *killer*  $CD8^+$ , e células NK é grandemente induzida pela IL-12 e IL-18 de

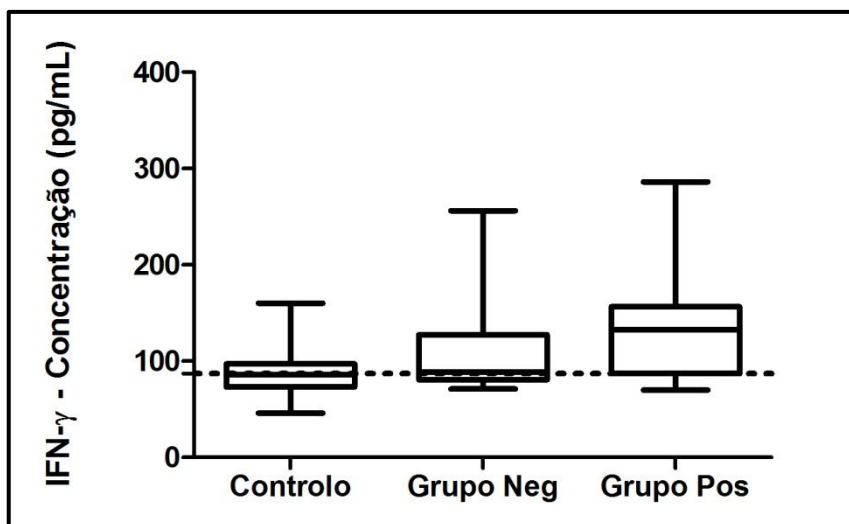
células apresentadoras de antígenos (APCs) tais como as células dendríticas (DCs) (Inoue, *et al.*, 2013).

Do total de amostras analisadas no grupo de soros sem reatividade serológica para anticorpos anti-*P.falciparum* (n=78), 34 encontram-se abaixo do valor de *cut-off* e 44 encontram-se acima do valor de *cut-off*. Este grupo de soros (soros negativos) apresentou uma mediana de 88 pg/mL, média de 107 pg/mL um valor mínimo de 71 pg/mL, máximo de 256 pg/mL, percentil 25 de 80 pg/mL e percentil 75 de 127 pg/mL.

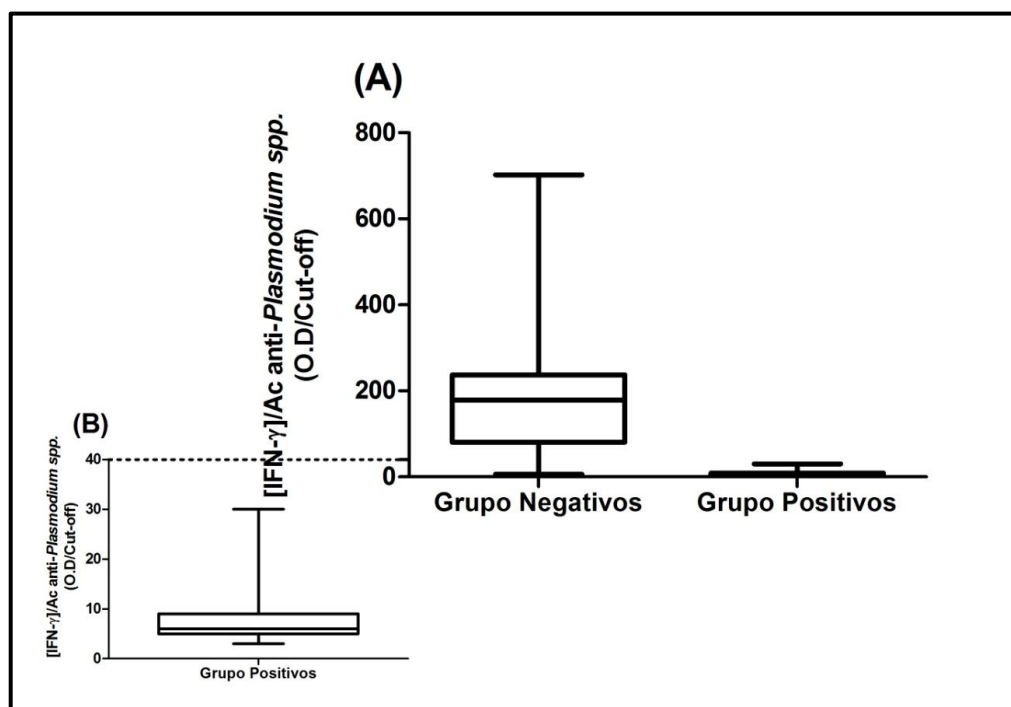
Do total de amostras analisadas no grupo de soros com reatividade serológica para anticorpos anti-*P.falciparum* (n=40), 9 encontram-se abaixo do valor de *cut-off* e 31 encontram-se acima do valor de *cut-off*. Este grupo de soros (soros positivos) apresentou uma mediana de 132 pg/mL, média de 135 pg/mL um valor mínimo de 70 pg/mL, máximo de 286 pg/mL, percentil 25 de 87 pg/mL e percentil 75 de 156 pg/mL.

Segundo o teste de Mann-Whitney, existem diferenças estatisticamente significativas na distribuição de ambos os grupos dado que  $P=0.004$  ( $<0,05$ ).

Também como forma de garantia do diagnóstico laboratorial e de confirmar a reatividade serológica determinada através do *ELISA* comercial para anticorpos anti-*Plasmodium spp.*, comparou-se o IFN- $\gamma$  com anticorpos específicos anti-*Plasmodium spp.* (ver Anexos II e II). Foi também verificado que quanto maior é o denominador (razão entre O.D/*Cut-off* do imunoensaio comercial), menor é a razão entre a concentração de IFN- $\gamma$  e a razão da O.D/*Cut-off* do *ELISA* comercial o que se verifica distintamente no grupo de pacientes com serologia positiva para anticorpos anti-*P.falciparum* (Figura 26). Pode dizer-se então que existe uma relação entre a citocina e os anticorpos: o grupo positivo diminui os seus valores e o grupo negativo aumenta.



**Figura 25:** Níveis séricos de IFN- $\gamma$  em amostras de soros de pacientes com clínica suspeita de malária. Foi feita a pesquisa de IFN- $\gamma$  num total de 132 soros. Grupo controlo (n=14); Grupo negativos (n=78); Grupo positivos (n=40). n=número de indivíduos. n=número de indivíduos.



**Figura 26:** Razão entre a concentração de IFN- $\gamma$  e anticorpos anti-*Plasmodium spp.* nos grupos serologicamente negativos (n=78) e serologicamente positivos (n=40) para *P.falciparum*; **(B)**: Devido ao contraste de resultados foi ampliado o gráfico com a razão entre os valores 0 e 40. n=número de indivíduos.

O IFN- $\gamma$  não é apenas um fator-chave na proteção contra a infecção por *Plasmodium*, mas também um fator de patogenicidade em sintomas de malária grave. Estudos anteriores em ratinhos com deficiência de IFN- $\gamma$  não desenvolveram malária cerebral experimental. Além disso ratinhos infetados tratados com anticorpos anti-IFN- $\gamma$  viveram durante mais tempo do que os tratados com IgG (Amani, *et al.*, 2000). Estes dados sugerem que o IFN- $\gamma$  é importante no desenvolvimento de sintomas de malária severa.

## 5. Conclusões e Perspetivas

A compreensão dos mecanismos fisiopatológicos da malária continua a ser um interessante objeto de investigação, podendo ser um importante contributo para a compreensão dos mecanismos envolvidos na gravidade da doença.

Neste estudo em que a mediana de idades é de 30 anos, com um predomínio do sexo masculino, verifica-se que os países para onde os indivíduos do estudo viajaram se situam maioritariamente no continente africano, com maior ênfase para o país angolano. O quadro de malária pode ser clinicamente indistinguível de outras doenças comuns, principalmente na fase inicial da infeção. Dos sintomas apresentados pelos pacientes, a febre e cefaleias foram os que predominaram. É também de ter em conta que houve uma elevada percentagem de indivíduos (80,5%) sem qualquer sintoma documentado em ficha clínica. Um dos sinais bem evidenciados em todos os pacientes positivos para malária é o de anemia e leucopénia.

A investigação desenvolvida ao longo deste trabalho permite concluir que o ensaio imunoenzimático *ELISA* anti-*P. falciparum* validado e otimizado, por comparação com o *ELISA* comercial (*MALARIA EIA TEST KIT*, BioRad, EUA), foi eficaz na identificação dos soros com e sem reatividade serológica para anticorpos anti-*P.falciparum*, bem como na determinação de anticorpos IgGs totais, IgG e IgM com um valor de especificidade de 68% e de sensibilidade de 61%.

Também se concluiu que os níveis de anticorpos do tipo IgG, nos soros dos indivíduos com reatividade serológica para anticorpos anti-*P.falciparum*, são mais elevados que os níveis de IgM. Informações adjacentes sobre os indivíduos recrutados para este estudo, tais como, realização ou não de tratamento profilático, e qual; o tempo que decorreu desde os primeiros sintomas e a recolha de sangue para análise; e a análise dos soros a diferentes tempos, desde o início da infeção, seriam importantes para uma melhor caracterização da população em estudo. Este resultado foi complementado com a pesquisa de isotipos de anticorpos específicos anti-*P. falciparum* do tipo IgG1, IgG3 e

IgG4, verificando-se para pacientes positivos para malária, valores de absorvância elevados para IgG1 e IgG3 e menores para IgG4 (IgG4<IgG3<IgG1).

Outro mediador inflamatório doseado foi a proteína do complemento C5a e a proteína C reativa (CRP) que demonstraram níveis elevados para indivíduos com ou sem reatividade serológica para anticorpos anti-*P.falciparum*. Não se conseguiu neste estudo, associar a expressão e o nível destes mediadores com a gravidade da doença, bem como a sua utilização como preditores de severidade da malária grave, sendo necessários mais estudos no futuro. No entanto conseguiu-se estabelecer uma relação entre as citocinas pró-inflamatórias estudadas (C5a, CRP e IFN- $\gamma$ ) e os anticorpos através da razão [citocina]/Anticorpos *anti-Plasmodium spp.*: o grupo positivo diminuiu os seus valores e o grupo negativo aumenta.

A citocina pró-inflamatória IFN- $\gamma$  demonstrou diferenças estatisticamente significativas com níveis mais elevados nos indivíduos com reatividade serológica para anticorpos anti-*P.falciparum*.

O balanço entre citocinas pró e anti-inflamatórias tem um papel *pivot* na regulação da resposta imune e patogénese da malária apesar de, até á data, o seu papel na patogénese da doença e relação com o fator protetor no hospedeiro continuar a não ser clara. Uma perspetiva futura para continuação deste trabalho seria o doseamento de mais citocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4 e IL-5 (perfil Th1 *versus* Th2).

Finalmente, pretendeu-se com este estudo contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos e clínicos na malária, esperando que no futuro haja mais trabalhos que ajudem a compreender os mecanismos que levam a que a malária continue a ser um fator de mortalidade e morbidade importante e que nos permita combater e tratar melhor a doença.



## 6. Referências Bibliográficas

- Adam, C. *et al.*, 1981. Cryoglobulins, Circulating Immune Complexes, and Complement Activation in Cerebral Malaria. *Infection and Immunity*, 31(2), pp. 530-535.
- Afridi, S. *et al.*, 2012. Malaria resistance genes are associated with the levels of IgG subclasses directed against *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens in Burkina Faso. *Malaria Journal*, 11(308), pp. 2-8.
- Aly, A. S., Vaughan, A. M. & Kappe, S. H., 2009. Malaria Parasite Development in the Mosquito and Infection of the Mammalian Host. *Annu Rev Microbiol.*, Volume 63, p. 195-221.
- Amani, V. *et al.*, 2000. Involvement of IFN- $\gamma$  receptor-mediated signaling in pathology and anti-malarial immunity induced by *Plasmodium berghei* infection. *Eur J Immunol*, Volume 30, pp. 1646-1655.
- Angulo, I. & Fresno, M., 2002. Cytokines in the Pathogenesis of and Protection against Malaria. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9(6), pp. 1145-1152.
- Ansar, W. *et al.*, 2006. Role of C-reactive protein in complement-mediated hemolysis in Malaria. *Glycoconj J*, Volume 23, pp. 233-240.
- Arosa, F. A., Cardoso, E. M. & Pacheco, F. C., 2007. *Fundamentos de Imunologia*. s.l.:Lidel.
- Artavanis-Tsakonas, K. & Riley, E., 2002. Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN- $\gamma$  from human NK cells by live *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Immunol*, Volume 169, pp. 2956-2963.
- Askling, H. H. *et al.*, 2012. Management of imported malaria in Europe. *Malaria Journal*, 11(328), pp. 2-15.
- Baker, D. A., 2010. Malaria gametocytogenesis. *Mol Biochem Parasitol.*, 172(2), pp. 57-65.
- Balthazar-Guedes, H., Ferreira-Da-Cruz, M., Montenegro-James, S. & Daniel-Ribeiro, C., 1995. Malaria diagnosis: Identification of an anti-40-kDa polypeptide antibody response associated with active or recent infection and study of the IgG/IgM ratio of antibodies to blood-stage *Plasmodium falciparum* antigens. *Parasitology Research*, Volume 81, pp. 305-309.

- Bangs, M. J. *et al.*, 2010. The dominant Anopheles vectors of human malaria in Africa, Europe and the Middle East: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasites & Vectors*, 3(117), pp. 1-34.
- Bengtsson, A. *et al.*, 2013. Transfected HEK293 Cells Expressing Functional Recombinant Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1) – A Receptor Associated with Severe *Plasmodium falciparum* Malaria. *PLOS ONE*, 8(7), pp. 1-7.
- BioRad, s.d. MALARIA EIA TEST KITS. In: *Instruction Manual*. s.l.:s.n.
- BIORAD, s.d. Quick Start™ Bradford Protein Assay.. In: *Instruction Manual*. s.l.:s.n.
- Botto, M. *et al.*, 2009. Complement in human diseases: Lessons from complement deficiencies.. *Molecular Immunology*, 46(14), pp. 2774-2783.
- Boudin, C. *et al.*, 1993. Possible role of specific immunoglobulin M antibodies to *Plasmodium falciparum* antigens in immunoprotection of humans living in a hyperendemic area, Burkina Faso. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(3), pp. 636-641.
- Bouharoun-Tayoun, Hasnaa & Druilhe, P., 1992. *Plasmodium falciparum* Malaria: Evidence for an Isotype Imbalance Which May Be Responsible for Delayed Acquisition of Protective Immunity. *Infection and Immunity*. , 60(4), pp. 1473-1481.
- Branch, O. H. *et al.*, 1998. A longitudinal investigation of IgG and IgM antibody responses to the merozoite surface protein-1 19-kilodalton domain of *Plasmodium falciparum* in pregnant women and infants: associations with febrile illness, parasitemia, and anemia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 58(2), pp. 211-219.
- Breman, J. G. & Holloway, C. N., 2007. Malaria Surveillance Counts. *J. Trop. Med. Hyg.*, 77(6), pp. 36-47.
- Brooker, S. *et al.*, 2007. Epidemiology of Plasmodium-Helminth co-infection in Africa: Populations at risk, potential impact on anemia and prospects for combining control. *Am J Trop Med Hyg*, 77(6), pp. 88-98.
- Burmester, G.-R. & Pezzutto, A., 2005. *Imunologia Texto e Atlas*. s.l.:LIDEL.
- Campuzano-Zuluaga, G., Hänscheid, T. & Grobusch, M. P., 2010. Automated haematology analysis to diagnose malaria. *Malaria Journal*, 9(346), pp. 1-15.
- Chen, Q., Schlichtherle, M. & Wahlgren, M., 2000. Molecular Aspects of Severe Malaria. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*, 13(3), p. 439–450.
- Chua, C. L. *et al.*, 2012. Monocytes and macrophages in malaria: protection or pathology?. *Cell Press*, pp. 1-7.

- Cibulskis, R. E. *et al.*, 2007. Estimating Trends in the Burden of Malaria at Country Level. *J. Trop. Med. Hyg.*, 77(6), pp. 133-137.
- Clark, I. A., Budd, A. C., Alleva, L. M. & Cowden, W. B., 2006. Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release. *Malaria Journal*, 5(85), pp. 1-35.
- Clark, I. A. & Schofield, L., 2000. Pathogenesis of Malaria. *Parasitology Today*, Volume 16, pp. 451-454.
- Conroy, A. *et al.*, 2009. C5a Enhances Dysregulated Inflammatory and Angiogenic Responses to Malaria In Vitro: Potential Implications for Placental Malaria. *PLoS ONE*, 4(3), pp. 1-10.
- Cook, G. C. & Zumla, A. I., 2009. *Manson's Tropical Diseases*. 22 ed. s.l.:Saunders Elsevier.
- Corran, P., Coleman, P., Riley, E. & Drakeley, C., 2007. Serology: a robust indicator of malaria transmission intensity?. *TRENDS in Parasitology*, Volume 23, pp. 575-582.
- Costa, R. M. *et al.*, 2013. Prevalence and Level of Antibodies Anti-*Plasmodium spp.* in Travellers with Clinical History of Imported Malaria. *Journal of Parasitology Research*.
- Costa, R. M. *et al.*, 2013. Immunoproteomic analysis of *Plasmodium falciparum* antigens using sera from patients with clinical history of imported malaria. *Malaria Journal*, Volume 12, p. 100.
- Cox, F. E., 2010. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasites & Vectors*, 3(5), pp. 1-9.
- Crawley, J., Chu, C., Mtove, G. & Nosten, F., 2010. Malaria in children. *Lancet*, Volume 375, p. 1468-1481.
- Crompton, P. D., Pierce, S. K. & Miller, L. H., 2010. Advances and challenges in malaria vaccine development. *The Journal of Clinical Investigation*, Volume 120, pp. 4168-4178.
- Czajkowsky, D. M. *et al.*, 2010. IgM, FcμRs, and Malarial Immune Evasion. *The Journal of Immunology*, 184(9), pp. 4597-4603.
- Davis, S. P. *et al.*, 2011. *Plasmodium falciparum*-induced CD36 clustering rapidly strengthens cytoadherence via p130CAS-mediated actin cytoskeletal rearrangement. *The FASEB Journal*, 26(3), p. 1119-1130.
- Day, N. & Dondorp, A. M., 2007. The Management of Patients with Severe Malaria. *J. Trop. Med. Hyg.*, Volume 77, pp. 29-35.

- Dondorp, A. M. *et al.*, 2010. Artesunate versus quinine in the treatment of severe *falciparum* malaria in African children (AQUAMAT): an open-label, randomised trial. *Lancet*, 376(9753), p. 1647–1657.
- Dondorp, A., Pongponratn, E. & White, N., 2004. Reduced microcirculatory flow in severe *falciparum* malaria: pathophysiology and electron-microscopic pathology. *Acta Trop.*, 89(3), pp. 309-317.
- Duarte, J. *et al.*, 2007. Total and functional parasite specific IgE responses in *Plasmodium falciparum* - infected patients exhibiting different clinical status. *Malaria Journal*, 6(1), pp. 1-13.
- Europe, W. H. O. R. O. f., 2014. *Centralized information system for infectious diseases (CISID)*. [Online] Available at: <http://data.euro.who.int/cisid> (Acedido a 23 de Abril de 2014)
- Fançon, C. *et al.*, 2013. Performance of microscopy and RDTs in the context of a malaria prevalence survey in Angola: a comparison using PCR as the gold standard. *Malaria Journal*, Volume 12, p. 284.
- Fortin, A., Stevenson, M. & Gros, P., 2002. Susceptibility to malaria as a complex trait: big pressure from a tiny creature. *Human Molecular Genetics*, 11(20), p. 2469–2478.
- Franklin, B. S. *et al.*, 2009. Malaria primes the innate immune response due to interferon- $\gamma$  induced enhancement of toll-like receptor expression and function. *PNAS*, 106(14), p. 5789–5794.
- Gardner, M. J. *et al.*, 2002. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*, Volume 419, pp. 498-511.
- Garraud, O., Perraut, R., Riveau, G. & Nutman, T., 2003. Class and subclass selection in parasite-specific antibody responses. *Trends in Parasitology*, 19(7), pp. 300-304.
- Genton, B. *et al.*, 2002. A recombinant blood-stage malaria vaccine reduces *Plasmodium falciparum* density and exerts selective pressure on parasite populations in a phase 1-2b trial in Papua New Guinea.. *J Infect Dis.* , 185(6), pp. 820-827.
- Greenwood, B. M. *et al.*, 2008. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(4), pp. 1266-1276.
- Guo, R.-F. & Ward, P. A., 2005. Role of C5a in inflammatory responses. *Annual Review of Immunology*, Volume 23, pp. 821-852.
- Gwer, S., Newton, C. R. & Berkley, J. A., 2007. Over-Diagnosis and Co-Morbidity of Severe Malaria in African Children: A Guide for Clinicians. *J. Trop. Med. Hyg.*, Volume 77, pp. 6-13.

- Hänscheid, T. *et al.*, 2008. Full blood count and haemozoin-containing leukocytes in children with malaria: diagnostic value and association with disease severity. *Malaria Journal*, 7(109), pp. 1-10.
- Harpaz, R. *et al.*, 1992. Serum Cytokine Profiles in Experimental Human Malaria: Relationship to Protection and Disease Course after Challenge. *J. Clin. Invest.*, Volume 90, pp. 515-523.
- Hay, S. I. *et al.*, 2010. Developing Global Maps of the Dominant Anopheles Vectors of Human Malaria. *PLOS MEDICINE*, 7(2), pp. 1-6.
- Ho, M. & White, N. J., 1999. Molecular mechanisms of cytoadherence in malaria. *The American Physiological Society*, 276(6), pp. 1231-1242.
- Huber-Lang, M. *et al.*, 2006. Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nat Med.*, 12(6), pp. 682-687.
- Hughes, K. R., Biagini, G. A. & Craig, A. G., 2010. Continued cytoadherence of *Plasmodium falciparum* infected red blood cells after antimalarial treatment. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 169(2), pp. 71-78.
- Inoue, S.-I., Niikura, M., Mineo, S. & Kobayash, F., 2013. Roles of IFN- $\gamma$  and  $\gamma\delta$ T cells in protective immunity against blood-stage malaria. *Frontiers in Immunology*, 4(258), pp. 1-9.
- Iriemenam, N. C. *et al.*, 2009. Cytokine profiles and antibody responses to *Plasmodium falciparum* malaria infection in individuals living in Ibadan, southwest Nigeria. *Afr. Health Sci.*, 9(2), pp. 66-74.
- Jiang, H., Robey, F. & Gewurz, H., 1992. Localization of sites through which C-reactive protein binds and activates complement to residues 14-26 and 76-92 of the human C1q A chain. *J. Exp. Med.*, 175(5), pp. 1373-1379.
- Kaca, W. & Roth, R., 1995. Activation of complement by human hemoglobin and by mixtures of hemoglobin and bacterial endotoxin. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1245(1), pp. 49-56.
- Killeen, G. F. *et al.*, 2013. Eliminating malaria vectors. *Parasites & Vectors*, 6(172), pp. 2-10.
- Koram, K. & Molyneux, M., 2007. When Is “Malaria” Malaria? The Different Burdens of Malaria Infection, Malaria Disease, and Malaria-Like Illnesses. *J. Trop. Med. Hyg.*, Volume 77, pp. 1-5.

- Kurtzhals, J. *et al.*, 1998. Low plasma concentrations of interleukin 10 in severe malarial anaemia compared with cerebral and uncomplicated malaria. *Lancet*, 351(9118), pp. 1768-1772.
- Kutis, J. D., Lanar, D. E., Opollo, M. & Duffy, P. E., 1999. Interleukin-10 Responses to Liver-Stage Antigen 1 Predict Human Resistance to *Plasmodium falciparum*. *Infection and Immunity*, 67(7), p. 3424–3429.
- Lackner, P. *et al.*, 2008. Complement factors C1q, C3 and C5 in brain and serum of mice with cerebral malaria. *Malaria Journal*, 7(207), pp. 1-9.
- Lalkhen, A. G. & McCluskey, A., 2008. Clinical tests: sensitivity and specificity, Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain. Volume 8, pp. 221-223.
- Langhorne, J., Ndungu, F. M., Sponaas, A.-M. & Marsh, K., 2008. Immunity to malaria: more questions than answers. *Nature Immunology*, Volume 9, pp. 725-732.
- Leoratti, F. M. *et al.*, 2008. Pattern of humoral immune response to *Plasmodium falciparum* blood stages in individuals presenting different clinical expressions of malaria. *Malaria Journal*, 7(186), pp. 1-11.
- Lindner, S. E., Miller, J. L. & Kappe, S. H. I., 2012. Malaria parasite pre-erythrocytic infection: preparation meets opportunity. *Cellular Microbiology*, 14(3), pp. 316-324.
- Lubell, Y. *et al.*, 2007. The Cost-Effectiveness of Parasitologic Diagnosis for Malaria-Suspected Patients in an Era of Combination Therapy. *J. Trop. Med. Hyg.*, 77(6), pp. 128-132.
- Mayer, D. C. G. *et al.*, 2001. Characterization of a *Plasmodium falciparum* erythrocyte-binding protein paralogous to EBA-175. *PNAS*, 98(9), pp. 5222-5227.
- Miller, L. H., Baruch, D. I., Marsh, K. & Doumbo, O. K., 2002. The pathogenic basis of malaria. *NATURE*, pp. 673-678.
- Morrisette, N. S. & Sibley, D. L., 2002. Cytoskeleton of Apicomplexan Parasites. *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS*, 66(1), pp. 21-38.
- Murray, H., Rubin, B. & Rothermel, C., 1983. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes. Evidence that interferon- $\gamma$  is the activating lymphokine.. *J Clin Invest*, Volume 72, pp. 1506-1510.
- Normark, J. *et al.*, 2007. PfEMP1-DBL1 $\alpha$  amino acid motifs in severe disease states of *Plasmodium falciparum* malaria. *PNAS*, 104(40), pp. 15835-15840.
- Nyakoe, N. K., Taylor, R. P., Makumi, J. N. & Waitumbi, J. N., 2009. Complement consumption in children with *Plasmodium falciparum* malaria. *Malaria Journal*, Volume 8:7, pp. 1-7.

- Obonyo, C. O., Vulule, J., Akhwale, W. S. & Grobbee, D. E., 2007. In-Hospital Morbidity and Mortality Due to Severe Malarial Anemia in Western Kenya. *J. Trop. Med. Hyg.*, Volume 77, pp. 23-28.
- OMS, 2011. *International Travel and Health*, s.l.: s.n.
- OMS, 2012. *International Travel and Health*, s.l.: s.n.
- OMS, 2012. *World Malaria Report 2012*, s.l.: s.n.
- Othoro, C. *et al.*, 1999. A Low Interleukin-10 Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Ratio Is Associated with Malaria Anemia in Children Residing in a Holoendemic Malaria Region in Western Kenya. *The Journal of Infectious Diseases*, Volume 179, pp. 279-282.
- Owusu-Agyei, S. *et al.*, 2001. Incidence of symptomatic and asymptomatic *Plasmodium falciparum* infection following curative therapy in adult residents of northern Ghana. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 65(3), pp. 197-203.
- Palma Dos Reis, I. *et al.*, 2012. Severe Imported Malaria in Clinical Care Patients. *Acta Med Port*, pp. 271-276.
- Pasternak, N. D. & Dzikowski, R., 2009. PfEMP1: An antigen that plays a key role in the pathogenicity and immune evasion of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41(7), p. 1463–1466.
- Patel, S. N. *et al.*, 2008. C5 deficiency and C5a or C5aR blockade protects against cerebral malaria. *The Journal of Experimental Medicine*, 205(5), pp. 1133-1143.
- Peerschke, E. I., Yin, W. & Ghebrehiwet, B., 2008. Platelet Mediated Complement Activation. *Adv Exp Med Biol.* , Volume 632, pp. 81-91.
- Penman, B. & Gupta, S., 2008. Evolution of virulence in malaria. *Journal of Biology* , 7(22), pp. 22.1-22.4.
- Pepys, M., 1981. C-reactive protein fifty years on. *Lancet* , Volume 21, p. 653–657.
- Perkins, D. J. *et al.*, 2011. Severe Malarial Anemia: Innate Immunity and Pathogenesis. *Int. J. Biol. Sci.*, 7(9), pp. 1427-1442.
- Perlmann, H. *et al.*, 1994. IgE elevation and IgE anti-malarial antibodies in *Plasmodium falciparum* malaria: association of high IgE levels with cerebral malaria. *Clin. Exp. Immunol.*, Volume 97, pp. 284-292.
- Peyron, F. *et al.*, 1994. High levels of circulating IL-10 in human malaria. *Clin. Exp. Immunol.*, Volume 95, pp. 300-303.

- Pingoud, A., Urbanke, C., Hoggett, J. & Jeltsch, A., 2005. *Biochemical Methods - A Concise Guide for Students and Researchers*. 1 ed. s.l.:WILEY-VCH.
- Plebanski, M. & Hill, A., 2000. The immunology of malaria infection. *Curr Opin Immunol.*, 12(4), pp. 437-441.
- Prakash, D. *et al.*, 2006. Clusters of Cytokines Determine Malaria Severity in *Plasmodium falciparum*-Infected Patients from Endemic Areas of Central India. *The Journal of Infectious Diseases*, Volume 194, p. 198-207.
- Roestenberg, M. *et al.*, 2007. Complement activation in experimental human malaria infection. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 101(7), pp. 643-649.
- Rogerson, S. *et al.*, 2007. Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity. *Lancet Infect Dis.*, 7(2), pp. 105-117.
- Rowe, J., Claessens, A., Corrigan, R. A. & Arman, M., 2009. Adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications. *expert reviews in molecular medicine*, 11(16), pp. 1-29.
- Schofield, L. & Grau, G., 2005. Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol.*, 5(9), pp. 722-735.
- Schreiber, N. *et al.*, 2006. Cerebral malaria is associated with IgG2 and IgG4 antibody responses to recombinant *Plasmodium falciparum* RIFIN antigen. *Microbes and Infection*, Volume 8, pp. 1269-1276.
- Sherman, I. W., Crandall, I. & Smith, H., 1992. Membrane proteins involved in the adherence of *Plasmodium falciparum* - infected erythrocytes to the endothelium. *Biol Cell*, Volume 74, pp. 161-178.
- Silver, K. L., Higgins, S. J., MacDonald, C. R. & Kain, K. C., 2010. Complement driven innate immune response to malaria: fuelling severe malarial diseases. *Cellular Microbiology*, pp. 1036-1045.
- Sim, B. K. *et al.*, 1994. Receptor and ligand domains for invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *Science*, Volume 24, pp. 1941-1944.
- Srinivasana, P. *et al.*, 2011. Binding of *Plasmodium* merozoite proteins RON2 and AMA1 triggers commitment to invasion. *PNAS Early Edition*, pp. 1-6.
- Stefan, H., Karine, K. & Kai, M., 2003. The *Plasmodium* sporozoite journey: a rite of passage. *Parasitology*, 19(3).
- Stevenson, M. M. & Riley, E. M., 2004. Innate immunity to malaria. *Nature Reviews Immunology*, Volume 4, pp. 169-180.



- Teklehaimanot, A., McCord, G. C. & Sachs, J. D., 2007. Scaling Up Malaria Control in Africa: An Economic and Epidemiological Assessment. *J. Trop. Med. Hyg.*, 77(6), pp. 138-144.
- Tuteja, R., 2007. Malaria - an overview. *FEBS Journal*, Volume 274, pp. 4670-4679.
- Vaughan, A. M., Aly, A. S. & Kappe, S. H., 2008. Malaria Parasite Pre-Erythrocytic Stage Infection: Gliding and Hiding. *Cell Host & Microbe*, Volume 4, pp. 209-218.
- Waitumbi, J. N. *et al.*, 2000. Red cell surface changes and erythrophagocytosis in children with severe *Plasmodium falciparum* anemia. *Blood Journal*, 65(4), pp. 1481-1486.
- Warrell, D. A., Molyneux, M. E. & Beales, P. F., 1990. *Severe and complicated malaria. World Health Organization Division of Control of Tropical Diseases. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. Second edition ed. s.l.:OMS.
- Wongsrichanalai, C. *et al.*, 2007. A Review of Malaria Diagnostic Tools: Microscopy and Rapid Diagnostic Test (RDT). *J. Trop. Med. Hyg.*, 77(6), pp. 119-127.
- Zougbedé, S. *et al.*, 2011. Metabolic acidosis induced by *Plasmodium falciparum* intraerythrocytic stages alters blood–brain barrier integrity. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, Volume 31, p. 514–526.

## ANEXOS

## Anexo I: Parecer do Comité de Ética do Instituto de Higiene e Medicina Tropical.

**CONSELHO DE ÉTICA**  
**INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL**  
**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

**Parecer sobre Protocolo de Estudo**

**Título do Estudo:** Papel de HMGB1 na desregulação da resposta imune na malária.

**Investigadores principais:** Catherine Ropert, Marcelo Sousa Silva, Jorge Alouguia e Luís Távora Távira.

**1- Justificativa e desenho do estudo**

O estudo proposto poderá trazer uma melhor compreensão dos mecanismos da resposta inflamatória na malária por *P. falciparum* e em consequência disto no seu tratamento. O seu desenho salvaguarda o bem-estar da população em estudo.

**2- Consentimento informado:**

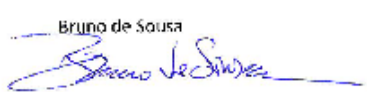
O consentimento informado, tal como revisto de acordo com as sugestões apresentadas por este Conselho, está correctamente elaborado e deverá poder ser aplicado na população em estudo sem maiores problemas.

**3- Conclusões**

As componentes éticas do estudo foram revistas de acordo com as sugestões efectuadas pelo Conselho de Ética do IHMT, aquando da sua primeira submissão. Este conselho aprova a versão revista do estudo "Papel de HMGB1 na desregulação da resposta imune na malária", considerando-o eticamente válido e justificado.


Lisboa, 24 de Janeiro 2012


Bruno de Sousa




Gilles Dussault

Jorge Selxas







**GILLES DUSSAULT**  
 Presidente do Conselho de Ética

*Parecer 15-2011-Pi*

Rua de Junqueira, 96 • 1348-098 Lisboa • PORTUGAL • Tel 21 3 657 600 • Fax 215 152 105 • [www.ihmt.unl.pt](http://www.ihmt.unl.pt)

**Anexo II:** Dados clínicos dos pacientes incluídos no estudo.

PACIENTE	IDADE	SEXO	DESTINO	SINTOMAS
C1	22	F	Não viajou	ND
C2	72	F	Não viajou	ND
C3	23	M	Não viajou	ND
C4	23	M	Não viajou	ND
C5	31	M	Não viajou	ND
C6	67	F	Não viajou	ND
C7	24	ND	Não viajou	ND
C8	30	ND	Não viajou	ND
C9	45	M	Não viajou	ND
C10	39	F	Não viajou	ND
C11	26	F	Não viajou	ND
C12	21	F	Não viajou	ND
C13	26	F	Não viajou	ND
C14	45	M	Não viajou	ND
P1	42	M	Angola	ND
P2	25	F	Angola	ND
P3	46	M	Angola	1
P4	39	M	Guiné	1
P5	28	F	Angola	7
P6	26	M	Angola	ND
P7	29	M	Guiné	ND
P8	21	F	ND	ND
P9	55	M	Moçambique	ND
P10	55	M	Moçambique	ND
P11	60	F	SR	1,5
P12	37	M	Índia	1,2,5
P13	44	M	ND	ND
P14	54	F	Angola	1
P15	26	M	Angola	ND
P16	59	M	Angola	ND
P17	21	F	Gabão	ND
P18	26	M	Angola	ND
P19	44	F	Angola	ND
P20	35	M	Angola	ND
P21	49	F	Moçambique	ND
P22	68	M	Angola	ND
P23	47	M	Angola	ND
P24	51	M	Angola	ND
P25	43	M	Angola	ND
P26	28	M	Angola	ND
P27	61	F	Moçambique	ND

P28	50	F	ND	ND
P29	52	M	Congo	ND
P30	27	F	Angola	ND
P31	29	M	Angola	ND
P32	69	M	Angola	1
P33	48	M	Angola	ND
P34	31	F	Angola	ND
P35	48	M	ND	ND
P36	37	M	ND	ND
P37	33	M	ND	ND
P38	37	M	Angola	ND
P39	30	F	ND	ND
P40	58	M	ND	ND
P41	29	F	Angola	ND
P42	36	M	Angola	ND
P43	52	M	Guiné	ND
P44	30	M	ND	ND
P45	43	M	Angola	ND
P46	37	F	ND	ND
P47	51	M	ND	ND
P48	34	M	Angola	ND
P49	53	M	ND	ND
P50	25	M	Moçambique	ND
P51	42	M	Moçambique	ND
P52	17	M	Angola	ND
P53	36	M	Angola	2
P54	25	F	Angola	1,2,4
P55	25	F	Angola	ND
P56	55	M	Guiné	ND
P57	49	F	Moçambique	1
P58	49	F	Moçambique	ND
P59	22	F	Angola	1,2
P60	26	M	Angola	ND
P61	23	M	Angola	ND
P62	23	M	ND	1
P63	22	M	ND	ND
P64	56	M	Angola	ND
P65	56	M	Angola	ND
P66	35	M	ND	ND
P67	56	M	Guiné	ND
P68	48	M	Angola	ND
P69	25	F	Angola	ND
P70	47	M	Angola	ND
P71	30	M	Angola	ND

P72	53	M	ND	ND
P73	29	F	ND	ND
P74	27	M	ND	ND
P75	52	M	Angola	1
P76	54	M	Angola	1
P77	35	M	Angola	3
P78	23	F	Angola	1
P79	34	F	Angola	ND
P80	40	M	Angola	ND
P81	24	M	Angola	ND
P82	56	F	ND	ND
P83	24	F	ND	1,2,5
P84	30	F	Angola	1
P85	30	M	Angola	ND
P86	53	M	São Tomé Príncipe	ND
P87	39	M	Angola	ND
P88	27	M	Guiné	ND
P89	38	M	Guiné	3,4
P90	28	M	ND	ND
P91	38	F	ND	ND
P92	51	M	Angola	ND
P93	21	M	Angola	ND
P94	37	M	Angola	ND
P95	36	F	Angola	ND
P96	29	M	Moçambique	ND
P97	48	F	ND	ND
P98	54	M	Moçambique	ND
P99	28	M	ND	ND
P100	21	M	ND	ND
P101	52	M	Angola	ND
P102	32	M	Angola	1
P103	49	M	Angola	1
P104	50	M	Moçambique	1,6
P105	40	F	ND	ND
P106	75	M	ND	ND
P107	42	M	ND	ND
P108	52	M	ND	ND
P109	28	F	São Tomé Príncipe	1
P110	50	M	Angola	ND
P111	28	F	Angola	ND
P112	53	M	ND	ND
P113	29	F	Angola	ND
P114	61	F	ND	ND

<b>P115</b>	30	F	ND	ND
<b>P116</b>	33	F	ND	ND
<b>P117</b>	52	M	ND	ND
<b>P118</b>	54	F	ND	ND

ND: Não documentado

1. Febre
2. Cefaleia
3. Dores articulares
4. Vômitos
5. Mialgias
6. Diarreia

**Anexo II:** Tabela referente às concentrações de C5a, CRP e IFN- $\gamma$  e respectivas razões com O.D/Cut-off do *ELISA* comercial (Grupo com reatividade serológica para anticorpos anti-*P.falciparum*).

Grupo Positivo (Pacientes)	[C5a] pg/mL	[CRP] pg/mL	[IFN- $\gamma$ ] pg/mL	DO/Cut-off ( <i>ELISA</i> comercial)	[C5a]/ <i>ELISA</i> comercial	[CRP]/ <i>ELISA</i> comercial	[IFN- $\gamma$ ]/ <i>ELISA</i> comercial
P54	1270	765	192	22,25	57	34	9
P55	1326	765	140	22,25	60	34	6
P56	2034	770	90	19,62	104	39	5
P57	1134	791	87	23,8	48	33	4
P58	1259	782	194	23,8	53	33	8
P61	1198	785	72	23,8	50	33	3
P62	825	768	84	23,8	35	32	4
P63	987	762	242	23,8	41	32	10
P64	896	783	86	23,8	38	33	4
P65	844	783	86	23,8	35	33	4
P67	1790	778	135	23,8	75	33	6
P68	1195	781	122	23,8	50	33	5
P70	2248	864	133	23,8	94	36	6
P74	745	785	143	21,56	35	36	7
P76	914	772	76	21,6	42	36	4
P77	1044	760	127	21,02	50	36	6
P78	752	786	136	21,6	35	36	6
P79	767	774	138	20,16	38	38	7
P80	1280	313	143	10,58	121	30	14
P82	1240	757	137	21,39	58	35	6
P84	1282	779	179	6,69	192	116	27
P85	949	786	197	21,52	44	37	9
P86	1113	773	120	14,3	78	54	8
P88	744	764	91	13,46	55	57	7
P89	741	1784	77	12,64	59	141	6
P90	1308	186	172	22,25	59	8	8
P92	880	1811	77	20,17	44	90	4
P94	947	1838	131	22,25	43	83	6
P95	705	1829	155	21,81	32	84	7
P97	396	1839	131	22,25	18	83	6
P98	1657	1800	132	10,61	156	170	12
P100	574	1749	70	22,25	26	79	3
P101	1386	1799	138	11,57	120	155	12
P104	2274	1735	204	13,34	170	130	15
P106	2042	1578	87	21,71	94	73	4
P108	513	496	257	8,53	60	58	30
P109	1144	619	286	22,21	51	28	13
P111	1045	1818	80	5,96	175	305	13
P117	1578	450	157	22,41	70	20	7
P118	1518	787	100	19,15	79	41	5

**Anexo III:** Tabela referente às concentrações de C5a, CRP e IFN- $\gamma$  e respectivas razões com O.D/Cut-off do *ELISA* comercial (Grupo sem reatividade serológica para anticorpos anti-*P.falciparum*).

Grupo Negativo (Pacientes)	[C5a]	[CRP]	[IFN- $\gamma$ ]	DO/Cut-off ( <i>ELISA</i> comercial)	[C5a]/ <i>ELISA</i> comercial	[CRP]/ <i>ELISA</i> comercial	[IFN- $\gamma$ ]/ <i>ELISA</i> comercial
P1	1944	753	87	0,62	3136	1214	141
P2	1059	778	89	0,61	1736	1275	146
P3	991	760	96	0,39	2542	1948	247
P4	889	773	79	0,45	1976	1719	176
P5	1102	795	90	0,79	1395	1006	114
P6	973	788	100	0,85	1145	927	118
P7	657	787	89	0,4	1644	1967	221
P8	328	774	89	0,45	729	1720	197
P9	736	761	83	0,34	2164	2238	245
P10	715	775	82	0,32	2233	2423	258
P11	924	774	156	0,8	1155	968	196
P12	1766	777	155	0,64	2760	1215	242
P13	1720	794	77	0,38	4525	2090	202
P14	816	788	87	0,64	1276	1231	136
P15	2236	783	79	0,41	5453	1909	192
P16	1663	778	84	0,34	4891	2288	246
P17	1711	720	90	0,34	5033	2118	266
P18	1907	783	80	0,32	5959	2447	249
P19	1517	679	86	0,36	4214	1887	239
P20	1814	639	81	0,78	2326	820	103
P21	1665	789	81	0,39	4270	2023	207
P22	1136	791	71	0,33	3442	2397	216
P23	1671	766	78	0,38	4398	2016	205
P24	1830	760	79	0,51	3589	1490	154
P25	944	737	96	0,27	3495	2731	354
P26	634	765	82	0,45	1409	1699	182
P27	1454	780	82	0,38	3827	2052	215
P28	2141	789	74	0,56	3823	1409	131
P29	401	708	77	0,31	1295	2283	247
P30	361	759	76	0,36	1002	2108	212
P31	449	758	82	0,31	1449	2447	266
P32	708	780	91	0,72	983	1083	126
P33	809	792	82	0,35	2310	2262	236
P34	226	613	88	0,62	365	989	142
P35	813	550	76	0,42	1935	1309	182
P36	1785	759	221	0,34	5251	2232	649
P37	1770	764	225	0,32	5531	2388	702
P38	2055	737	90	0,32	6421	2305	282
P39	1138	769	102	0,45	2528	1709	227
P40	1052	776	80	0,34	3094	2283	236
P41	1421	792	85	0,31	4584	2556	275
P42	1157	787	86	0,39	2967	2019	221
P43	2270	793	79	0,39	5820	2033	203
P44	469	746	93	0,68	689	1097	136
P45	1789	757	76	0,52	3441	1457	145
P46	1248	771	249	0,36	3465	2142	690
P47	1431	746	161	0,33	4338	2261	488
P48	1663	771	92	0,41	4056	1881	224
P49	872	778	91	0,49	1780	1588	187
P50	773	759	88	0,4	1933	1897	220
P51	804	741	97	0,4	2009	1852	243
P52	386	706	87	0,36	1072	1961	242
P53	396	597	79	0,51	776	1171	154
P59	1178	1782	76	9,23	128	193	8
P60	680	1774	80	2,18	312	814	37
P66	1126	1532	142	2,26	498	678	63
P69	829	1831	85	2,36	351	776	36
P71	830	1827	144	1,06	783	1724	136
P72	1056	1846	89	1,13	935	1633	79
P73	961	1801	200	1,27	757	1418	157
P75	2195	1774	127	1,12	1960	1584	113
P81	991	1385	129	10,71	93	129	12
P83	1331	1796	72	12,93	103	139	6
P87	899	1780	153	3,28	274	543	47
P91	1832	1268	84	7,4	248	171	11
P93	1520	1582	98	8,2	185	193	12
P96	1460	1733	256	5,42	269	320	47
P99	619	848	182	1,15	538	737	158
P102	466	1785	72	1,2	389	1488	60
P103	1205	1720	174	5,54	218	311	31
P105	2075	700	230	3,78	549	185	61
P107	707	1781	137	2,3	307	774	60
P110	806	588	126	3,83	211	153	33
P112	535	1264	86	1,21	442	1044	71
P113	514	1921	136	1,67	308	1150	82
P114	1216	1738	136	12,26	99	142	11
P115	1898	1747	96	1,23	1543	1421	78
P116	1583	1775	146	1,37	1155	1296	106



